

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

具有經修飾之單元間連結及/或末端基團之寡核苷酸類似物

OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES HAVING MODIFIED

INTERSUBUNIT LINKAGES AND/OR TERMINAL GROUPS

【技術領域】

本發明一般而言係關於適用作反義化合物之寡核苷酸化合物(寡聚物)，且更特定而言係關於包含經修飾之單元間連結及/或末端基團之寡聚物化合物，及該等寡聚物化合物在反義應用中之用途。

相關申請案之交叉引用

本申請案根據35 U.S.C. §119(e)之規定主張2010年5月28日申請之美國臨時專利申請案第61/349,783號、2010年7月6日申請之美國臨時專利申請案第61/361,878號及2010年9月24日申請之美國臨時專利申請案第61/386,428之權益。

關於序列表之聲明

與本申請案相關之序列表以文本格式替代紙質複本形式提供，且藉此以引用的方式併入本說明書中。含有序列表之文本檔案的名稱為120178_487TW_SEQUENCE_LISTING.txt。文本檔案為約17 KB，創建於2011年4月26日。

【先前技術】

反義寡聚物一般旨在結合於致病蛋白質之DNA或RNA以阻止該等蛋白質產生。成功實施反義療法之要求包括(a)活體內穩定性，(b)足夠膜滲透性及細胞吸收，及(c)結合親和力與序列特異性之良好平衡。已研發出許多寡核苷酸類似物，其中原生DNA之磷酸二酯連結由

對核酸酶降解具抗性之其他連結置換(參見例如Barawkar, D.A.等人, *Proc. Na't'l Acad. Sci. USA* 95(19):11047-52 (1998); Linkletter, B.A.等人, *Nucleic Acids Res.* 29(11):2370-6 (2001); Micklefield, J., *Curr, Med, Chem*, 8(10):1157-79 (2001))。亦已製得具有其他多種主鏈修飾之反義寡核苷酸(Crooke, S.T., *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications*, New York, Marcel Dekker (2001); Micklefield, J., *Curr, Med, Chem*, 8(10):1157-79 (2001); Crooke, S.T., *Antisense Drug Technology*, Boca Raton, CRC Press (2008))。另外, 已藉由肽結合來修飾寡核苷酸以增強細胞吸收(Moulton, H.M.等人, *Bioconjug Chem* 15(2):290-9 (2004); Nelson, M.H.等人, *Bioconjug. Chem.* 16(4):959-66 (2005); Moulton, H.M.等人, *Biochim Biophys Acta* (2010))。

該等核酸類似物作為反義或反基因藥物之效能因各種類似物之某些特徵而受阻。舉例而言, 具有帶負電荷之連結的類似物(包括經硫代磷酸酯連結之類似物)在寡聚物與DNA或RNA標靶之負電荷之間具有相當大的靜電排斥。硫代磷酸酯亦展現與諸如蛋白質之其他細胞組分的非特異性結合。此等屬性限制了包含原生RNA、原生DNA及帶負電荷之類似物之反義寡聚物的治療有效性(Crooke, S.T., *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications*, New York, Marcel Dekker (2001); Crooke, S.T., *Antisense Drug Technology*, Boca Raton, CRC Press (2008))。經非離子性磷酸甲酯連結之寡核苷酸類似物可藉由被動擴散及/或流體相內飲作用而輸送至細胞中, 但其用途因立體異構複雜性及不良溶解度而受阻(Crooke, S.T., *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications*, New York, Marcel Dekker (2001); Micklefield, J., *Curr, Med, Chem*, 8(10):1157-79 (2001))。

若干群體已報導帶正電荷之寡核苷酸的合成(Bailey, C.P.等人, *Nucleic Acids Res.* 26(21):4860-7 (1998); Micklefield, J., *Curr, Med, Chem*, 8(10):1157-79 (2001); Egli, M.等人, *Biochemistry* 44(25):9045-57 (2005))。舉例而言, 已報導一類經胍(guanidinium)連結之核苷(命名為DNG), 其係藉由以非對掌性胍基置換DNA及RNA中之磷酸酯連結而形成(Dempcy, R.O.等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91(17):7864-8 (1994); Dempcy, R.O.等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 93(9):4326-30 (1996); Barawkar, D.A. 等人, *Proc. Na't'l Acad. Sci. USA* 95(19):11047-52 (1998); Linkletter, B.A.等人, *Nucleic Acids Res.* 29(11):2370-6 (2001))。亦已報導與帶正電荷之甲基化硫脲連結相連結之寡聚物(Arya, D.P.等人, *Proc. Nat'l Acad. Sci U S A* 96(8): 4384-9 (1999))。已報導以中性脲連結置換此等連結中之一些連結來減少該等帶正電荷之寡聚物發生非序列特異性結合之趨勢(Linkletter, B.A.等人, *Bioorg. Med. Chem.* 8(8):1893-901 (2000))。先前已描述含有(1-哌嗪基)亞膦氧基及(1-(4-(ω -胍基-烷醯基))-哌嗪基)亞膦氧基連結之嗎啉基寡聚物(參見例如WO 2008036127)。

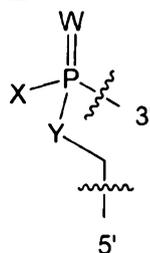
儘管已取得顯著進展, 但此項技術中仍需要具有改良之反義或反基因效能之寡核苷酸類似物。該改良之反義或反基因效能包括: 在不損害序列選擇性之情況下對DNA及RNA之親和力較強; 藥物動力學及組織分佈改良; 細胞傳遞改良; 及活體內分佈可靠且可控制。

【發明內容】

本發明之化合物解決了此等問題且提供優於此項技術中之現有反義分子的改良。對單元間連結之修飾及/或末端部分與寡核苷酸類似物(例如嗎啉基寡核苷酸)之5'及/或3'末端之結合產生具有優良特性之反義寡聚物。舉例而言, 在某些實施例中, 所揭示之寡聚物具有與其他寡核苷酸類似物相比增強之細胞傳遞、效能及/或組織分佈, 及/

或可有效地傳遞至標靶器官。此等優良特性使得治療指數較佳，臨床劑量減少及商品成本降低。

在一個實施例中，本發明提供一種包含主鏈之寡聚物，該主鏈包含由單元間連結接合之嗎啉基環結構之序列，該等單元間連結使一個嗎啉基環結構之3'端與相鄰嗎啉基環結構之5'端接合，其中各嗎啉基環結構結合於鹼基配對部分，使得該寡聚物可依序列特異性方式結合於標靶核酸，其中該等單元間連結具有以下通式結構(I)：



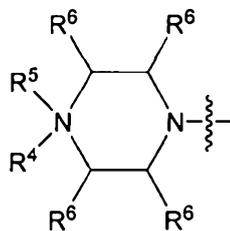
(I)

或其鹽或異構體，且其中該等單元間連結(I)各獨立地為連結(A)或連結(B)：

其中，對於連結(A)而言：

W在每次出現時獨立地為S或O；

X在每次出現時獨立地為 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{NR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{OR}^3$ ，或



(II)；

Y在每次出現時獨立地為O或 $-\text{NR}^2$ ；

R^1 在每次出現時獨立地為氫或甲基；

R^2 在每次出現時獨立地為氫或 $-\text{LNR}^4\text{R}^5\text{R}^7$ ；

R^3 在每次出現時獨立地為氫或 C_1 - C_6 烷基；

R^4 在每次出現時獨立地為氫、甲基、 $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{Z-L-}$

$\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 或 $-\text{[C}(\text{O})\text{CHR}'\text{NH]}_m\text{H}$ ，其中Z為羰基(C(O))或直接鍵，
R'為天然產生之胺基酸之側鏈或其一碳或二碳同系物，且m為1至6；

R^5 在每次出現時獨立地為氫、甲基或電子對；

R^6 在每次出現時獨立地為氫或甲基；

R^7 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基烷基；

L為視情況存在之長度為至多18個原子之連結子，其包含烷基、
烷氧基或烷基胺基，或其組合；且

其中，對於連結(B)而言：

W在每次出現時獨立地為S或O；

X在每次出現時獨立地為 $-\text{NR}^8\text{R}^9$ 或 $-\text{OR}^3$ ；且

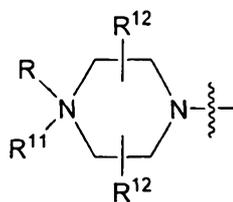
Y在每次出現時獨立地為O或 $-\text{NR}^{10}$ ；

R^8 在每次出現時獨立地為氫或 C_2 - C_{12} 烷基；

R^9 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 芳烷基或芳
基；

R^{10} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基或 $-\text{LNR}^4\text{R}^5\text{R}^7$ ；

其中 R^8 與 R^9 可接合形成5-18員單環或雙環雜環，或 R^8 、 R^9 或 R^3 可
與 R^{10} 接合形成5-7員雜環，且其中當X為4-哌嗪基時，X具有以下結構
(III)：



(III)

其中：

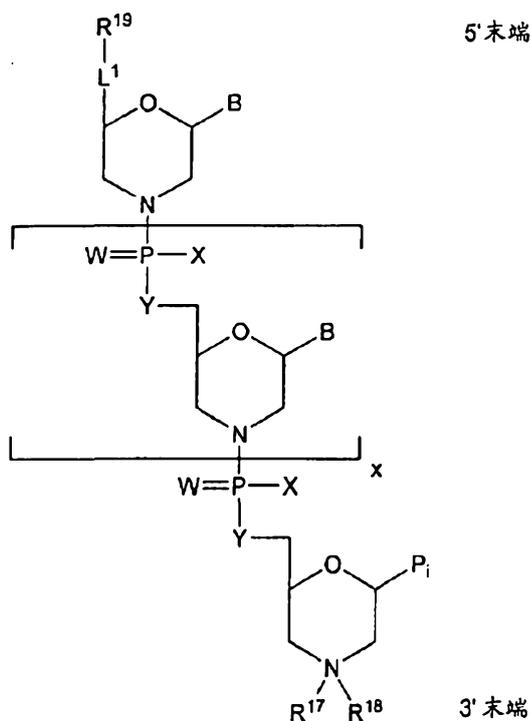
R^{11} 在每次出現時獨立地為 C_2 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 胺基烷基、 C_1 - C_{12}
烷基羰基、芳基、雜芳基或雜環基；且

R在每次出現時獨立地為電子對、氫或 C_1 - C_{12} 烷基；且

R^{12} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 胺基烷基、 $-NH_2$ 、 $-NR^{13}R^{14}$ 、 $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ 、 C_1 - C_{12} 烷基羰基、側氧基(oxo)、 $-CN$ 、三氟甲基、醯胺基、脒基(amidinyI)、脒基烷基、脒基烷基羰基、胍基、胍基烷基、胍基烷基羰基、膽酸酯基(cholate)、去氧膽酸酯基、芳基、雜芳基、雜環、 $-SR^{13}$ 或 C_1 - C_{12} 烷氧基，其中 R^{13} 、 R^{14} 及 R^{15} 在每次出現時獨立地為 C_1 - C_{12} 烷基；及

其中該等單元間連結中之至少一者為連結(B)。

在另一實施例中，本發明提供一種包含經修飾之末端基團之寡聚物，舉例而言，在一個實施例中，本發明提供一種包含主鏈之寡聚物，該主鏈包含由(A)型單元間連結、(B)型單元間連結或其組合接合之嗎啉基環結構之序列，其中各嗎啉基環結構載有鹼基配對部分，使得該寡聚物化合物可依序列特異性方式結合於標靶核酸，且其中該寡聚物包含3'末端、5'末端且具有以下結構(XVII)：



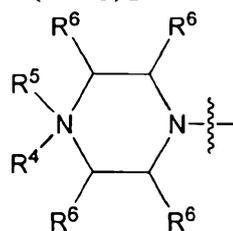
(XVII)

或其鹽或異構體，且

其中，對於連結(A)而言：

W在每次出現時獨立地為S或O；

X在每次出現時獨立地為 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{NR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{OR}^3$ ，或



(II)；

Y在每次出現時獨立地為O或 $-\text{NR}^2$ ；

R^1 在每次出現時獨立地為氫或甲基；

R^2 在每次出現時獨立地為氫或 $-\text{LNR}^4\text{R}^5\text{R}^7$ ；

R^3 在每次出現時獨立地為氫或 C_1 - C_6 烷基；

R^4 在每次出現時獨立地為氫、甲基、 $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{Z-L-NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 或 $-\text{[C(O)CHR}'\text{NH}]_m\text{H}$ ，其中Z為羰基($\text{C}(\text{O})$)或直接鍵， R' 為天然產生之胺基酸之側鏈或其一碳或二碳同系物，且m為1至6；

R^5 在每次出現時獨立地為氫、甲基或電子對；

R^6 在每次出現時獨立地為氫或甲基；

R^7 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基烷基；

L為視情況存在之長度為至多18個原子之連結子，其包含烷基、烷氧基或烷基胺基，或其組合；且

其中，對於連結(B)而言：

W在每次出現時獨立地為S或O；

X在每次出現時獨立地為 $-\text{NR}^8\text{R}^9$ 或 $-\text{OR}^3$ ；且

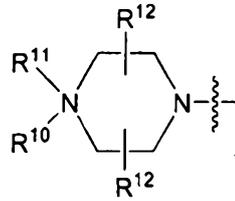
Y在每次出現時獨立地為O或 $-\text{NR}^{10}$ ；

R^8 在每次出現時獨立地為氫或 C_2 - C_{12} 烷基；

R^9 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 芳烷基或芳基；

R^{10} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基或 $-LNR^4R^5R^7$ ；

其中 R^8 與 R^9 可接合形成5-18員單環或雙環雜環或 R^8 、 R^9 或 R^3 可與 R^{10} 接合形成5-7員雜環，且其中當X為4-哌嗪基時，X具有以下結構(III)：



(III)

其中：

R^{10} 在每次出現時獨立地為 C_2 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 胺基烷基、 C_1 - C_{12} 烷基羰基、芳基、雜芳基或雜環基；且

R^{11} 在每次出現時獨立地為電子對、氫或 C_1 - C_{12} 烷基；

R^{12} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 胺基烷基、 $-NH_2$ 、 $-NR^{13}R^{14}$ 、 $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ 、 C_1 - C_{12} 烷基羰基、 $-CN$ 、三氟甲基、醯胺基、脒基、脒基烷基、脒基烷基羰基、胍基、胍基烷基、胍基烷基羰基、膽酸酯基、去氧膽酸酯基、芳基、雜芳基、雜環、 $-SR^{13}$ 或 C_1 - C_{12} 烷氧基，其中 R^{13} 、 R^{14} 及 R^{15} 在每次出現時獨立地為 C_1 - C_{12} 烷基；且

R^{17} 在每次出現時獨立地為不存在、氫或 C_1 - C_6 烷基；

R^{18} 及 R^{19} 在每次出現時獨立地為不存在、氫、細胞穿透肽、天然或非天然胺基酸、 C_2 - C_{30} 烷基羰基、 $-C(=O)OR^{21}$ 或 R^{20} ；

R^{20} 在每次出現時獨立地為胍基、雜環基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_6 - C_{30} 芳基、 C_7 - C_{30} 芳烷基、 C_3 - C_{30} 烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基烷基羰基、 C_7 - C_{30} 芳基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基羰基、 C_2 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_3 - C_8 環烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳氧基羰基、 C_8 - C_{30} 芳烷氧基羰基或 $-P(=O)(R^{22})_2$ ；

R^{21} 為包含一或多個氧或羥基部分或其組合之 C_1 - C_{30} 烷基；

各 R^{22} 獨立地為 C_6-C_{12} 芳氧基；

B為鹼基配對部分；

L^1 為視情況存在之長度為至多18個原子之連結子，其包含選自烷基、羥基、烷氧基、烷基胺基、醯胺、酯、羰基、胺基甲酸酯、磷二醯胺酸、磷醯胺酸、硫代磷酸酯、哌嗪及磷酸二酯之鍵；

x為0或大於0之整數；且

其中 R^{18} 或 R^{19} 中之至少一者為 R^{20} 且其限制條件為 R^{17} 與 R^{18} 兩者均存在。

在另一實施例中，本發明提供一種抑制蛋白質產生之方法，該方法包含使編碼該蛋白質之核酸暴露於本發明之寡聚物。

在另一實施例中，本發明係有關一種治療個體之疾病的方法，該方法包含投與治療有效量之寡聚物。亦提供製造寡聚物之方法及其使用方法。

本發明之此等及其他態樣藉由參考以下[實施方式]將顯而易知。為此目的，本文闡述各種參考文獻，其更詳細地描述某些背景資訊、程序、化合物及/或組合物，且各藉此以全文引用的方式併入。

【圖式簡單說明】

圖1A展示包含磷二醯胺酸連結之例示性嗎啉基寡聚物結構；

圖1B展示如圖1A中之嗎啉基寡聚物，但其中主鏈連結包含一個哌嗪基磷二醯胺酸連結；

圖1C展示富含精胺酸肽與反義寡聚物之結合物；

圖1D-G展示例示性嗎啉基寡核苷酸之重複單元區段，命名為1D至1G；

圖2描繪與嗎啉基-T部分連結之例示性單元間連結；

圖3為展示製備用於固相合成之連結子的反應流程；

圖4展示用於寡聚物合成之固體支撐物的製備；

圖5展示代表性寡聚物之外顯子跳越活性；

圖6為展示mdx小鼠模型中之外顯子跳越的條形圖；

圖7A-7C提供以例示性寡聚物處理轉殖基因eGFP小鼠之結果；

圖8展示經例示性寡聚物處理之細胞中之病毒M2蛋白質含量的減少；

圖9展示經例示性寡聚物處理之小鼠的抗病毒活性及重量損失；

圖10提供經例示性寡聚物處理之小鼠的體重資料；

圖11為與PMO及PMO⁺寡聚物相比，經例示性寡聚物處理之小鼠之各種組織中的eGFP剪接校正活性資料；及

圖12展示與PMO及PMO⁺寡聚物相比，經例示性寡聚物處理之小鼠之各種組織中的eGFP剪接校正活性資料之子組。

【實施方式】

I. 定義

在以下描述中，闡述某些特定細節以提供對各個實施例之充分理解。然而，熟習此項技術者應瞭解，可在不存在此等細節之情況下實施本發明。在其他情況下，未展示或詳細描述熟知結構以避免不必要地模糊實施例之描述。除非本文另有要求，否則在通篇說明書及以下申請專利範圍中，詞語「包含」及其變化形式以開放的包括性意義來理解，亦即，如同「包括(但不限於)」。此外，本文提供之標題僅為方便起見且並不說明所主張之發明內容的範疇或含義。

在通篇說明書中提及「一個實施例」意謂結合實施例描述之特定特徵、結構或特點包括於至少一個實施例中。因此，在通篇說明書中各處所出現之片語「在一個實施例中」未必皆指代同一實施例。此外，特定特徵、結構或特點可依任何適合方式於一或多個實施例中組合。又，除非本文另有明確指示，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所用之單數形式「一」及「該」包括複數指示物。亦應注意，除

非本文另有明確指示，否則術語「或」一般以其包括「及/或」之意義使用。

除非另有指示，否則如本文所用之以下術語具有以下含義：

「胺基」係指-NH₂基團。

「氰基」或「腈」係指-CN基團。

「羥基」係指-OH基團。

「亞胺基」係指=NH取代基。

「胍基」係指-NHC(=NH)NH₂取代基。

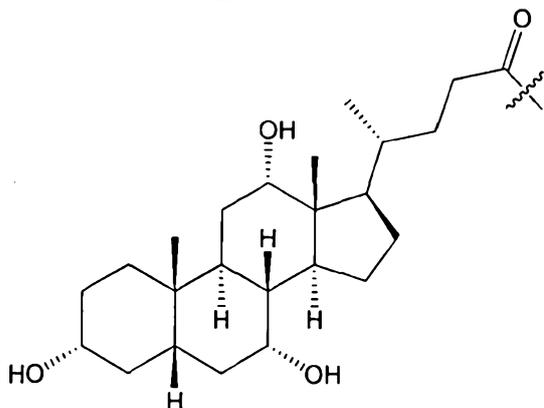
「脒基」係指-C(=NH)NH₂取代基。

「硝基」係指-NO₂基團。

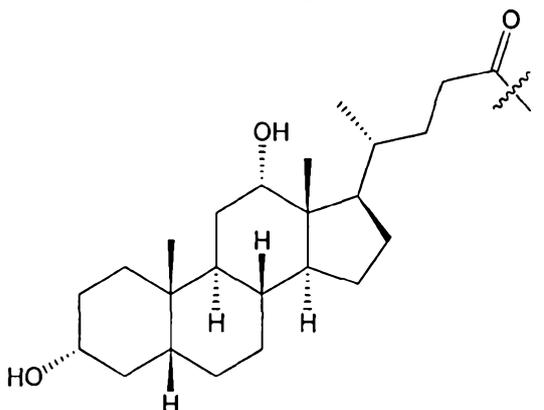
「側氧基」係指=O取代基。

「硫酮基」係指=S取代基。

「膽酸酯基」係指以下結構：



「去氧膽酸酯基」係指以下結構：



「烷基」係指如下直鏈或分支鏈烴鏈基團：其為飽和或不飽和的(亦即，含有一或多個雙鍵及/或參鍵)，具有1至30個碳原子，且經單鍵與分子之其餘部分連接。包含1至30個範圍內之任何碳原子數的烷基包括在內。包含至多30個碳原子之烷基稱作C₁-C₃₀烷基，同樣地，舉例而言，包含至多12個碳原子之烷基為C₁-C₁₂烷基。包含其他碳原子數之烷基(及本文所定義之其他部分)以類似方式表示。烷基包括(但不限於)C₁-C₃₀烷基、C₁-C₂₀烷基、C₁-C₁₅烷基、C₁-C₁₀烷基、C₁-C₈烷基、C₁-C₆烷基、C₁-C₄烷基、C₁-C₃烷基、C₁-C₂烷基、C₂-C₈烷基、C₃-C₈烷基及C₄-C₈烷基。代表性烷基包括(但不限於)甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(異丙基)、正丁基、異丁基、第二丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(第三丁基)、3-甲基己基、2-甲基己基、乙烯基、丙-1-烯基、丁-1-烯基、戊-1-烯基、戊-1,4-二烯基、乙炔基、丙炔基、丁-2-炔基、丁-3-炔基、戊炔基、己炔基及其類似基團。除非本說明書中另有特定說明，否則烷基可如下文所述視情況經取代。

「伸烷基」或「伸烷基鏈」係指將分子之其餘部分與基團連結之直鏈或分支鏈二價烴鏈。伸烷基可為飽和或不飽和的(亦即，含有一或多個雙鍵及/或參鍵)。代表性伸烷基包括(但不限於)C₁-C₁₂伸烷基、C₁-C₈伸烷基、C₁-C₆伸烷基、C₁-C₄伸烷基、C₁-C₃伸烷基、C₁-C₂伸烷基、C₁伸烷基。代表性伸烷基包括(但不限於)亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸正丁基、伸乙烯基、伸丙烯基、伸正丁烯基、伸丙炔基、伸正丁炔基及其類似基團。伸烷基鏈經單鍵或雙鍵與分子之其餘部分連接且經單鍵或雙鍵與基團連接。伸烷基鏈與分子之其餘部分及與基團之連接點可為鏈中之一個碳或任何兩個碳。除非本說明書中另有特定說明，否則伸烷基鏈可如下文所述視情況經取代。

「烷氧基」係指式-OR_a之基團，其中R_a為所定義之烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則烷氧基可如下文所述視情況經取代。

「烷氧基烷基」係指式- R_bOR_a 之基團，其中 R_a 為所定義之烷基且其中 R_b 為所定義之伸烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則烷氧基烷基可如下文所述視情況經取代。

「烷基羰基」係指式- $C(=O)R_a$ 之基團，其中 R_a 為如上文所定義之烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則烷基羰基可如下文所述視情況經取代。

「烷氧基羰基」係指式- $C(=O)OR_a$ 之基團，其中 R_a 為所定義之烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則烷氧基羰基可如下文所述視情況經取代。

「烷基胺基」係指式- NHR_a 或- NR_aR_a 之基團，其中各 R_a 獨立地為如上文所定義之烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則烷基胺基可如下文所述視情況經取代。

「醯胺基」係指式- $N(H)C(=O)R_a$ 之基團，其中 R_a 為如本文所定義之烷基或芳基。除非本說明書中另有特定說明，否則醯胺基可如下文所述視情況經取代。

「脒基烷基」係指式- $R_b-C(=NH)NH_2$ 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則脒基烷基可如下文所述視情況經取代。

「脒基烷基羰基」係指式- $C(=O)R_b-C(=NH)NH_2$ 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則脒基烷基羰基可如下文所述視情況經取代。

「胺基烷基」係指式- $R_b-NR_aR_a$ 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基，且各 R_a 獨立地為氫或烷基。

「硫烷基」係指式- SR_a 之基團，其中 R_a 為如上文所定義之烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則硫烷基可視情況經取代。

「芳基」係指衍生自包含氫、6至30個碳原子及至少一個芳族環

之烴環系統的基團。芳基可為單環、雙環、三環或四環系統，其可包括稠合或橋連環系統。芳基包括(但不限於)衍生自乙烯合蔥、乙烯合萘、乙烯合菲、蔥、甘菊環、苯、蒄、丙二烯合萸、萸、*as*-二環戊二烯并苯、*s*-二環戊二烯并苯、茛滿、茛、萘、丙烯合萘、菲、七曜烯(pleiadene)、萘及聯伸三苯之烴環系統的芳基。除非本說明書中另有特定說明，否則術語「芳基」或字首「芳-」(諸如在「芳烷基」中)意欲包括視情況經取代之芳基。

「芳烷基」係指式- R_b-R_c 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基鏈且 R_c 為一或多個如上文所定義之芳基，例如苄基、二苯甲基、三苯甲基及其類似基團。除非本說明書中另有特定說明，否則芳烷基可視情況經取代。

「芳基羰基」係指式- $C(=O)R_c$ 之基團，其中 R_c 為一或多個如上文所定義之芳基(例如苯基)。除非本說明書中另有特定說明，否則芳基羰基可視情況經取代。

「芳氧基羰基」係指式- $C(=O)OR_c$ 之基團，其中 R_c 為一或多個如上文所定義之芳基(例如苯基)。除非本說明書中另有特定說明，否則芳氧基羰基可視情況經取代。

「芳烷基羰基」係指式- $C(=O)R_b-R_c$ 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基鏈且 R_c 為一或多個如上文所定義之芳基(例如苯基)。除非本說明書中另有特定說明，否則芳烷基羰基可視情況經取代。

「芳烷氧基羰基」係指式- $C(=O)OR_b-R_c$ 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基鏈且 R_c 為一或多個如上文所定義之芳基(例如苯基)。除非本說明書中另有特定說明，否則芳烷氧基羰基可視情況經取代。

「芳氧基」係指式- OR_c 之基團，其中 R_c 為一或多個如上文所定義之芳基(例如苯基)。除非本說明書中另有特定說明，否則芳基羰基可視情況經取代。

「環烷基」係指穩定的非芳族單環或多環碳環，其可包括稠合或橋連環系統，為飽和或不飽和的，且經單鍵與分子之其餘部分連接。代表性環烷基包括(但不限於)具有3至15個碳原子之環烷基及具有3至8個碳原子之環烷基。單環環烷基包括例如環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基及環辛基。多環基團包括例如金剛烷基、降萘基、十氫萘基及7,7-二甲基-雙環[2.2.1]庚基。除非本說明書中另有特定說明，否則環烷基可視情況經取代。

「環烷基烷基」係指式 $-R_bR_d$ 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基鏈且 R_d 為如上文所定義之環烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則環烷基烷基可視情況經取代。

「環烷基羰基」係指式 $-C(=O)R_d$ 之基團，其中 R_d 為如上文所定義之環烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則環烷基羰基可視情況經取代。

「環烷氧基羰基」係指式 $-C(=O)OR_d$ 之基團，其中 R_d 為如上文所定義之環烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則環烷氧基羰基可視情況經取代。

「稠合」係指本文所述之任何環結構與現有環結構稠合。當稠合環為雜環基環或雜芳基環時，成為稠合雜環基環或稠合雜芳基環之一部分的現有環結構上之任何碳原子可經氮原子置換。

「胍基烷基」係指式 $-R_b-NHC(=NH)NH_2$ 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則胍基烷基可如下文所述視情況經取代。

「胍基烷基羰基」係指式 $-C(=O)R_b-NHC(=NH)NH_2$ 之基團，其中 R_b 為如上文所定義之伸烷基。除非本說明書中另有特定說明，否則胍基烷基羰基可如下文所述視情況經取代。

「鹵基」或「鹵素」係指溴、氯、氟或碘。

「鹵烷基」係指如上文所定義之烷基經一或多個如上文所定義鹵基取代，例如三氟甲基、二氟甲基、氟甲基、三氯甲基、2,2,2-三氟乙基、1,2-二氟乙基、3-溴-2-氟丙基、1,2-二溴乙基及其類似基團。除非本說明書中另有特定說明，否則鹵烷基可視情況經取代。

「全鹵」或「全氟」係指其中各氫原子已分別經鹵原子或氟原子置換之部分。

「雜環基」或「雜環」係指包含2至23個碳原子及1至8個選自由氮、氧、磷及硫組成之群之雜原子的穩定3至24員非芳族環基。除非本說明書中另有特定說明，否則雜環基可為單環、雙環、三環或四環系統，其可包括稠合或橋連環系統；且雜環基中之氮、碳或硫原子可視情況經氧化；氮原子可視情況經四級銨化；且雜環基可為部分或完全飽和的。該等雜環基之實例包括(但不限於)二氧雜環戊烷基、噻吩基[1,3]二噻烷基、十氫異喹啉基、咪唑啉基、咪唑啉基、異噻唑啉基、異噻唑啉基、嗎啉基、八氫吡啶基、八氫異吡啶基、2-側氧基哌嗪基、2-側氧基哌啶基、2-側氧基吡咯啉基、噁唑啉基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯啉基、吡唑啉基、吡啶基、噻唑啉基、四氫呋喃基、三噻烷基、四氫哌喃基、硫代嗎啉基、噻嗎啉基、1-側氧基-硫代嗎啉基、1,1-二側氧基-硫代嗎啉基、12-冠-4、15-冠-5、18-冠-6、21-冠-7、氮雜-18-冠-6、二氮雜-18-冠-6、氮雜-21-冠-7及二氮雜-21-冠-7。除非本說明書中另有特定說明，否則雜環基可視情況經取代。

「雜芳基」係指包含氮原子、1至13個碳原子、1至6個選自由氮、氧、磷及硫組成之群之雜原子及至少一個芳族環之5至14員環系統基團。就本發明而言，雜芳基可為單環、雙環、三環或四環系統，其可包括稠合或橋連環系統；且雜芳基中之氮、碳或硫原子可視情況經氧化；氮原子可視情況經四級銨化。實例包括(但不限於)氮呋基、

基、烷氧基羰基、芳基、芳烷基、芳基羰基、芳氧基羰基、芳烷基羰基、芳烷氧基羰基、芳氧基、環烷基、環烷基烷基、環烷基羰基、環烷基烷基羰基、環烷氧基羰基、雜環基、雜芳基、二烷基胺、芳基胺、烷基芳基胺、二芳基胺、N-氧化物、醯亞胺及烯胺；諸如三烷基矽烷基、二烷基芳基矽烷基、烷基二芳基矽烷基、三芳基矽烷基之基團中之矽原子；全氟烷基或全氟烷氧基，例如三氟甲基或三氟甲氧基。「經取代」亦意謂任何上述基團中之一或多個氫原子經連接於雜原子之高級鍵(例如雙鍵或參鍵)置換，該雜原子為諸如側氧基、羰基、羧基及酯基中之氧；及諸如亞胺、肟、脞及脞之基團中之氮。舉例而言，「經取代」包括任何上述基團中之一或多個氫原子經 $-\text{NR}_g\text{C}(=\text{O})\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{C}(=\text{O})\text{OR}_h$ 、 $-\text{NR}_g\text{SO}_2\text{R}_h$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{OR}_g$ 、 $-\text{SR}_g$ 、 $-\text{SOR}_g$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}_g$ 、 $=\text{NSO}_2\text{R}_g$ 及 $-\text{SO}_2\text{NR}_g\text{R}_h$ 置換。「經取代」亦意謂任何上述基團中之一或多個氫原子經 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_g$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}_g$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{R}_g$ 、 $-\text{CH}_2\text{SO}_2\text{NR}_g\text{R}_h$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}_g$ 或 $-\text{SSR}_g$ 置換。在前述基團中， R_g 及 R_h 相同或不同且獨立地為氫、烷基、烷氧基、烷基胺基、硫烷基、芳基、芳烷基、環烷基、環烷基烷基、鹵烷基、雜環基、N-雜環基、雜環基烷基、雜芳基、N-雜芳基及/或雜芳基烷基。另外，前述各取代基亦可視情況經一或多個上述取代基取代。此外，任何上述基團可經取代而包括一或多個內部氧或硫原子。舉例而言，烷基可經一或多個內部氧原子取代以形成醚或聚醚基團。類似地，烷基可經一或多個內部硫原子取代以形成硫醚、二硫化物等。醯胺基部分可經至多2個鹵原子取代，而其他上述基團可經一或多個鹵原子取代。除烷基外，所有其他基團亦可經胺基或單烷基胺基取代。除烷基及烷基羰基外，所有其他基團亦可經胍基或脒基取代。任何上述基團之視情況存在之取代基亦包括芳基磷醯基，例如 $-\text{R}_a\text{P}(\text{Ar})_3$ ，其中 R_a 為伸烷基且 Ar 為芳基部分(例如苯基)。

術語「反義寡聚物」或「反義化合物」可互換使用且係指單元之序列，各單元具有在由核糖或其他戊糖或嗎啉基組成之主鏈單元上所帶有之鹼基，且其中主鏈基團係由單元間連結來連結，使得化合物中之鹼基藉由沃森-克里克鹼基配對(Watson-Crick base pairing)與核酸(通常為RNA)中之標靶序列雜交，從而在標靶序列內形成核酸:寡聚物異雙螺旋。寡聚物可與標靶序列具有精確序列互補性或接近互補。該等反義寡聚物旨在阻斷或抑制含有標靶序列之mRNA轉譯，且可稱作「針對於」與其雜交之序列。

「嗎啉基寡聚物」或「PMO」係指具有載有能夠與典型聚核苷酸氫鍵結之鹼基之主鏈的聚合分子，其中該聚合物缺乏戊糖主鏈部分，且更特定言之缺乏由核苷酸及核苷所特有之磷酸二酯鍵連結之核糖主鏈，但替代地含有經環氮偶合之環氮。例示性「嗎啉基」寡聚物包含由(硫代)磷醯胺酸或(硫代)磷二醯胺酸連結而連結在一起之嗎啉基單元結構，其將一個單元之嗎啉基氮與相鄰單元之5'環外碳接合，各單元包含藉由鹼基特異性氫鍵結而有效結合於聚核苷酸中之鹼基的嘌呤或嘧啶鹼基配對部分。嗎啉基寡聚物(包括反義寡聚物)詳述於例如美國專利第5,698,685號、第5,217,866號、第5,142,047號、第5,034,506號、第5,166,315號、第5,185,444號、第5,521,063號、第5,506,337號；及申請中之美國專利申請案第12/271,036號、第12/271,040號；及PCT公開案第WO/2009/064471號中，該等案皆以全文引用的方式併入本文中。代表性PMO包括其中單元間連結為連結(A1)之PMO。

「PMO+」係指磷二醯胺酸嗎啉基寡聚物，其包含任何數目之(1-哌嗪基)亞磷氧基、(1-(4-(ω -胍基-烷醯基))-哌嗪基)亞磷氧基連結(A2及A3)，該等連結先前已有描述(參見例如PCT公開案WO/2008/036127，該案以全文引用的方式併入本文中)。

「PMO-X」係指本文所揭示之磷二醯胺酸嗎啉基寡聚物，其包含至少一個(B)連結或至少一個所揭示之末端修飾。

「磷醯胺酸」基團包含連接有三個氧原子且連接有一個氮原子之磷，而「磷二醯胺酸」基團(參見例如圖1D-E)包含連接有兩個氧原子且連接有兩個氮原子之磷。在本文及同在申請中之美國專利申請案第61/349,783號及第11/801,885號所述之寡聚物之不帶電荷或經修飾之單元間連結中，一個氮始終側接於主鏈。磷二醯胺酸連結中之第二氮通常為嗎啉基環結構中之環氮。

「硫代磷醯胺酸」或「硫代磷二醯胺酸」連結分別為其中一個氧原子(通常為側接於主鏈之氧)經硫置換之磷醯胺酸或磷二醯胺酸連結。

「單元間連結」係指連接兩個嗎啉基單元之連結，例如結構(I)。

如本文所用之「帶電荷」、「不帶電荷」、「陽離子性」及「陰離子性」係指化學部分在近中性pH值(例如約6至8)下之主要狀態。舉例而言，該術語可指代化學部分在生理pH值(亦即約7.4)下之主要狀態。

「低碳數烷基」係指具有1至6個碳原子之烷基，如甲基、乙基、正丁基、異丁基、第三丁基、異戊基(isoamyl)、正戊基及異戊基(isopentyl)所例示。在某些實施例中，「低碳數烷基」具有1至4個碳原子。在其他實施例中，「低碳數烷基」具有1至2個碳原子；亦即甲基或乙基。類似地，「低碳數烯基」係指具有2至6個、較佳3或4個碳原子之烯基，如烯丙基及丁烯基所例示。

「非干擾性」取代基為不會不利地影響如本文所述之反義寡聚物結合於其預定標靶之能力的取代基。該等取代基包括小的及/或相對非極性之基團，諸如甲基、乙基、甲氧基、乙氧基或氟。

若寡核苷酸或反義寡聚物在生理條件下與標靶聚核苷酸雜交，則該寡聚物與該標靶「特異性地雜交」，其中 T_m 高於 37°C 、高於 45°C 、較佳為至少 50°C 且通常為 60°C - 80°C 或 80°C 以上。寡聚物之「 T_m 」為與互補聚核苷酸50%雜交時之溫度。 T_m 係於標準條件下在生理鹽水中測定，如例如Miyada等人，*Methods Enzymol.* **154**:94-107 (1987)中所述。該雜交可在反義寡聚物與標靶序列「接近」或「實質上」互補，以及精確互補之情況下發生。

當兩個單股聚核苷酸之間以反平行組態發生雜交時，將聚核苷酸描述為彼此「互補」。根據一般公認之鹼基配對法則，就預期彼此形成氫鍵之相反股中鹼基之比例而言，可定量互補度(一個聚核苷酸與另一聚核苷酸互補之程度)。

若聚核苷酸之序列為在生理條件下與第二聚核苷酸序列特異性結合或特異性雜交之第一序列，則第一序列為關於第二序列之「反義序列」。

術語「靶向序列」為寡核苷酸類似物中與RNA基因組中之標靶序列互補(換言之，意謂實質上互補)之序列。類似物化合物之整個序列或僅一部分可與標靶序列互補。舉例而言，在具有20個鹼基之類似物中，僅12-14可為靶向序列。靶向序列通常由類似物中之相連鹼基形成，但可替代地由非相連序列形成，該等非相連序列當置於一起(例如自類似物之相反端)時，構成橫跨標靶序列之序列。

當標靶序列與靶向序列以反平行組態發生雜交時，將其描述為彼此「互補」。靶向序列可與標靶序列「接近」或「實質上」互補，且仍出於本發明所述方法之目的而發揮功能，亦即仍為「互補」的。較佳地，本發明所述方法中所採用之寡核苷酸類似物化合物與標靶序列在10個核苷酸中具有至多一個錯配，且較佳在20個核苷酸中具有至多一個錯配。或者，所採用之反義寡聚物與本文所指定之例示性靶向

序列具有至少90%之序列同源性且較佳至少95%之序列同源性。出於與RNA標靶互補性結合之目的，且如下文所論述，鳥嘌呤鹼基可與胞嘧啶或尿嘧啶RNA鹼基互補。

「異雙螺旋」係指寡核苷酸類似物與標靶RNA之互補部分之間形成的雙螺旋。「核酸酶抗性異雙螺旋」係指反義寡聚物與其互補標靶結合所形成之異雙螺旋，使得該異雙螺旋對能夠切斷雙股RNA/RNA或RNA/DNA複合物之細胞內及細胞外核酸酶(諸如RNAse H)所引起之活體內降解實質上具抗性。

當藥劑可藉由除被動擴散以外之機制穿過細胞膜進入細胞時，該藥劑係「由哺乳動物細胞主動吸收」。藥劑可例如藉由「主動輸送」(係指藉由例如ATP依賴性輸送機制輸送藥劑穿過哺乳動物細胞膜)或藉由「促進輸送」(係指藉由需要藥劑與輸送蛋白結合，隨後促進所結合之藥劑通過膜之輸送機制輸送反義藥劑穿過細胞膜)來輸送。

術語「調節表現」及/或「反義活性」係指反義寡聚物藉由干擾RNA之表現或轉譯來增強或更為通常減少特定蛋白質之表現的能力。在蛋白質表現減少之情況下，反義寡聚物可直接阻斷特定基因之表現，或有助於自彼基因轉錄之RNA的加速斷裂。咸信，如本文所述之嗎啉基寡聚物經由前一(空間阻斷)機制起作用。儘管已使用嗎啉基寡聚物成功靶向其他區域，但空間阻斷寡聚物之較佳反義標靶包括ATG起始密碼子區域、剪接位點、緊鄰剪接位點之區域及mRNA之5'-未轉譯區域。

「胺基酸單元」較佳為 α -胺基酸殘基(-CO-CHR-NH-)；其亦可為 β -胺基酸殘基或其他胺基酸殘基(例如-CO-CH₂CHR-NH-)，其中R為胺基酸側鏈。

術語「天然產生之胺基酸」係指自然界中所見之蛋白質中存在

之胺基酸。術語「非天然胺基酸」係指自然界中所見之蛋白質中不存在之胺基酸；實例包括 β -丙胺酸(β -Ala)及6-胺基己酸(Ahx)。

「有效量」或「治療有效量」係指以單次劑量或一系列劑量之一部分投與哺乳動物個體之反義寡聚物的量，其通常藉由抑制所選標靶核酸序列之轉譯來有效產生所要治療效果。

對個體(例如哺乳動物，諸如人類)或細胞之「治療」為在試圖改變個體或細胞之自然過程中所用的任何類型之介入。治療包括(但不限於)投與醫藥組合物，且可預防性地進行或在病理性事件起始後或與病原物質(etiological agent)接觸後進行。

II. 反義寡聚物

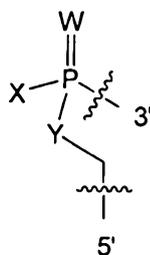
A. 具有經修飾之單元間連結之寡聚物

如上文所述，本發明之一個實施例係有關包含新穎單元間連結之寡聚物。在一些實施例中，寡聚物與相應未經修飾之寡聚物相比對DNA及RNA具有較高親和力，且與具有其他單元間連結之寡聚物相比展示改良之細胞傳遞、效能及/或組織分佈特性。在一個實施例中，寡聚物包含至少一個如上文所定義之(B)型單元間連結。寡聚物亦可包含一或多個如上文所定義之(A)型單元間連結。各種連結類型及寡聚物之結構特徵及特性更詳細地描述於以下論述中。

1. 連結(A)

申請者已發現，反義活性、生物分佈及/或其他所需特性之增強可藉由製備具有各種單元間連結之寡聚物來優化。舉例而言，寡聚物可視情況包含一或多個(A)型單元間連結，且在某些實施例中，寡聚物包含至少一個(A)型連結。在一些其他實施例中，各(A)型連結具有相同結構。(A)型連結可包括共同擁有之美國專利第7,943,762號中所揭示之連結，該專利藉此以全文引用的方式併入。連結(A)具有以下結構(I)，其中3'及5'指示分別與嗎啉基環(亦即下文所論述之結構(i))

之3'及5'端之連接點：

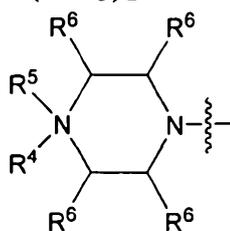


I

或其鹽或異構體，其中：

W在每次出現時獨立地為S或O；

X在每次出現時獨立地為 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{NR}^1\text{R}^2$ 、 $-\text{OR}^3$ ，或



(II)；

Y在每次出現時獨立地為O或 $-\text{NR}^2$ ；

R^1 在每次出現時獨立地為氫或甲基；

R^2 在每次出現時獨立地為氫或 $-\text{LNR}^4\text{R}^5\text{R}^7$ ；

R^3 在每次出現時獨立地為氫或 C_1 - C_6 烷基；

R^4 在每次出現時獨立地為氫、甲基、 $-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-\text{Z}-\text{L}-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 或 $-\text{[C}(=\text{O})\text{CHR}'\text{NH}]_m\text{H}$ ，其中Z為 $-\text{C}(=\text{O})-$ 或直接鍵， R' 為天然產生之胺基酸之側鏈或其一碳或二碳同系物，且m為1至6；

R^5 在每次出現時獨立地為氫、甲基或電子對；

R^6 在每次出現時獨立地為氫或甲基；

R^7 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基烷基；且

L為視情況存在之長度為至多18個原子之連結子，其包含烷基、烷氧基或烷基胺基，或其組合。

在一些實例中，寡聚物包含至少一個(A)型連結。在一些其他實

施例中，寡聚物包括至少兩個連續(A)型連結。在其他實施例中，寡聚物中至少5%之連結為(A)型；舉例而言，在一些實施例中，5%至95%、10%至90%、10%至50%或10%至35%之連結可為(A)型連結。在一些特定實施例中，至少一個(A)型連結為 $-N(CH_3)_2$ 。在其他實施例中，各(A)型連結為 $-N(CH_3)_2$ 。在其他實施例中，至少一個(A)型連結為哌嗪-1-基，例如未經取代之哌嗪-1-基(例如A2或A3)。在其他實施例中，各(A)型連結為哌嗪-1-基，例如未經取代之哌嗪-1-基。

在一些實施例中，W在每次出現時獨立地為S或O，且在某些實施例中，W為O。

在一些實施例中，X在每次出現時獨立地為 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^1R^2$ 、 $-OR^3$ 。在一些實施例中，X為 $-N(CH_3)_2$ 。在其他態樣中，X為 $-NR^1R^2$ ，且在其他實施例中，X為 $-OR^3$ 。

在一些實施例中， R^1 在每次出現時獨立地為氫或甲基。在一些實施例中， R^1 為氫。在其他實施例中，X為甲基。

在一些實施例中， R^2 在每次出現時為氫。在其他實施例中， R^2 在每次出現時為 $-LNR^4R^5R^7$ 。在一些實施例中， R^3 在每次出現時獨立地為氫或 C_1 - C_6 烷基。在其他實施例中， R^3 為甲基。在其他實施例中， R^3 為乙基。在一些其他實施例中， R^3 為正丙基或異丙基。在一些其他實施例中， R^3 為 C_4 烷基。在其他實施例中， R^3 為 C_5 烷基。在一些實施例中， R^3 為 C_6 烷基。

在某些實施例中， R^4 在每次出現時獨立地為氫。在其他實施例中， R^4 為甲基。在其他實施例中， R^4 為 $-C(=NH)NH_2$ ，且在其他實施例中， R^4 為 $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ 。在其他實施例中， R^4 為 $-[C(=O)CHR^1NH]_mH$ 。在一個實施例中，Z為 $-C(=O)-$ ，且在另一實施例中，Z為直接鍵。 R^1 為天然產生之胺基酸之側鏈。在一些實施例中， R^1 為天然產生之胺基酸之側鏈的一碳或二碳同系物。

m 為1至6之整數。 m 可為1。 m 可為2。 m 可為3。 m 可為4。 m 可為5。 m 可為6。

在一些實施例中， R^5 在每次出現時獨立地為氫、甲基或電子對。在一些實施例中， R^5 為氫。在其他實施例中， R^5 為甲基。在其他實施例中， R^5 為電子對。

在一些實施例中， R^6 在每次出現時獨立地為氫或甲基。在一些實施例中， R^6 為氫。在其他實施例中， R^6 為甲基。

在其他實施例中， R^7 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_6 烷基或 C_2 - C_6 烷氧基烷基。在一些實施例中， R^7 為氫。在其他實施例中， R^7 為 C_1 - C_6 烷基。在其他實施例中， R^7 為 C_2 - C_6 烷氧基烷基。在一些實施例中， R^7 為甲基。在其他實施例中， R^7 為乙基。在其他實施例中， R^7 為正丙基或異丙基。在一些其他實施例中， R^7 為 C_4 烷基。在一些實施例中， R^7 為 C_5 烷基。在一些實施例中， R^7 為 C_6 烷基。在其他實施例中， R^7 為 C_2 烷氧基烷基。在一些其他實施例中， R^7 為 C_3 烷氧基烷基。在其他實施例中， R^7 為 C_4 烷氧基烷基。在一些實施例中， R^7 為 C_5 烷氧基烷基。在其他實施例中， R^7 為 C_6 烷氧基烷基。

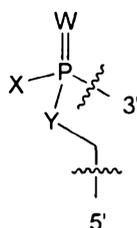
如上文所述之連結子基團L在其主鏈中含有選自烷基(例如- CH_2 - CH_2 -)、烷氧基(例如- C - O - C -)及烷基胺基(例如- CH_2 - NH -)之鏈，其限制條件為L中之末端原子(例如與羰基或氮相鄰之原子)為碳原子。儘管可能存在分支鏈連結(例如- CH_2 - CH CH_3 -)，但連結子一般為未分支的。在一個實施例中，連結子為烴連結子。此種連結子可具有結構 $(CH_2)_n$ -，其中 n 為1-12，較佳為2-8，且更佳為2-6。

提供具有任何數目之(A)型連結之寡聚物。在一些實施例中，寡聚物不含(A)型連結。在某些實施例中，5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%之連結為連結(A)。在所選實施例中，10%至80%、20%至80%、20%至60%、20%至50%、20%至40%

或20%至35%之連結為連結(A)。

2. 連結(B)

在一些實施例中，寡聚物包含至少一個(B)型連結。舉例而言，寡聚物可包含1個、2個、3個、4個、5個、6個或6個以上(B)型連結。(B)型連結可相鄰或可散佈於整個寡聚物中。(B)型連結具有以下結構(I)：



(I)

或其鹽或異構體，其中：

W在每次出現時獨立地為S或O；

X在每次出現時獨立地為 $-NR^8R^9$ 或 $-OR^3$ ；且

Y在每次出現時獨立地為O或 $-NR^{10}$ ；

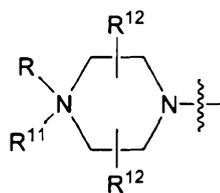
R^3 在每次出現時獨立地為氫或 C_1-C_6 烷基；

R^8 在每次出現時獨立地為氫或 C_2-C_{12} 烷基；

R^9 在每次出現時獨立地為氫、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 芳烷基或芳基；

R^{10} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1-C_{12} 烷基或 $-LNR^4R^5R^7$ ；

其中 R^8 與 R^9 可接合形成5-18員單環或雙環雜環或 R^8 、 R^9 或 R^3 可與 R^{10} 接合形成5-7員雜環，且其中當X為4-哌嗪基時，X具有以下結構(III)：



(III)

其中：

R^{11} 在每次出現時獨立地為 C_2 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 胺基烷基、 C_1 - C_{12} 烷基羰基、芳基、雜芳基或雜環基；

R 在每次出現時獨立地為電子對、氫或 C_1 - C_{12} 烷基；且

R^{12} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 胺基烷基、 $-NH_2$ 、 $-NR^{13}R^{14}$ 、 $-NR^{13}R^{14}R^{15}$ 、 C_1 - C_{12} 烷基羰基、側氧基、 $-CN$ 、三氟甲基、醯胺基、脞基、脞基烷基、脞基烷基羰基、胍基、胍基烷基、胍基烷基羰基、膽酸酯基、去氧膽酸酯基、芳基、雜芳基、雜環、 $-SR^{13}$ 或 C_1 - C_{12} 烷氧基，其中 R^{13} 、 R^{14} 及 R^{15} 在每次出現時獨立地為 C_1 - C_{12} 烷基。

在一些實施例中，寡聚物包含一個(B)型連結。在一些其他實施例中，寡聚物包含兩個(B)型連結。在一些其他實施例中，寡聚物包含三個(B)型連結。在一些其他實施例中，寡聚物包含四個(B)型連結。在其他實施例中，(B)型連結為連續的(亦即，(B)型連結彼此相鄰)。在其他實施例中，寡聚物中至少5%之連結為(B)型；舉例而言，在一些實施例中，5%-95%、10%至90%、10%至50%或10%至35%之連結可為(B)型連結。

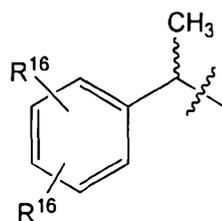
在其他實施例中， R^3 在每次出現時獨立地為氫或 C_1 - C_6 烷基。在其他實施例中， R^3 可為甲基。在一些實施例中， R^3 可為乙基。在一些其他實施例中， R^3 可為正丙基或異丙基。在其他實施例中， R^3 可為 C_4 烷基。在一些實施例中， R^3 可為 C_5 烷基。在一些實施例中， R^3 可為 C_6 烷基。

在一些實施例中， R^8 在每次出現時獨立地為氫或 C_2 - C_{12} 烷基。在一些實施例中， R^8 為氫。在其他實施例中， R^8 為乙基。在一些其他實施例中， R^8 為正丙基或異丙基。在一些實施例中， R^8 為 C_4 烷基。在其他實施例中， R^8 為 C_5 烷基。在其他實施例中， R^8 為 C_6 烷基。在一些實

施例中， R^8 為 C_7 烷基。在其他實施例中， R^8 為 C_8 烷基。在其他實施例中， R^8 為 C_9 烷基。在其他實施例中， R^8 為 C_{10} 烷基。在一些其他實施例中， R^8 為 C_{11} 烷基。在其他實施例中， R^8 為 C_{12} 烷基。在一些其他實施例中， R^8 為 C_2 - C_{12} 烷基，且 C_2 - C_{12} 烷基包括一或多個雙鍵(例如烯烴)、參鍵(例如炔烴)或兩者。在一些實施例中， R^8 為未經取代之 C_2 - C_{12} 烷基。

在一些實施例中， R^9 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 芳烷基或芳基。在一些實施例中， R^9 為氫。在其他實施例中， R^9 為 C_1 - C_{12} 烷基。在其他實施例中， R^9 為甲基。在其他實施例中， R^9 為乙基。在一些其他實施例中， R^9 為正丙基或異丙基。在一些實施例中， R^9 為 C_4 烷基。在一些實施例中， R^9 為 C_5 烷基。在其他實施例中， R^9 為 C_6 烷基。在一些其他實施例中， R^9 為 C_7 烷基。在一些實施例中， R^9 為 C_8 烷基。在一些實施例中， R^9 為 C_9 烷基。在一些其他實施例中， R^9 為 C_{10} 烷基。在一些其他實施例中， R^9 為 C_{11} 烷基。在其他實施例中， R^9 為 C_{12} 烷基。

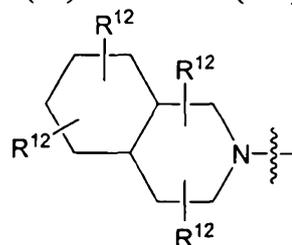
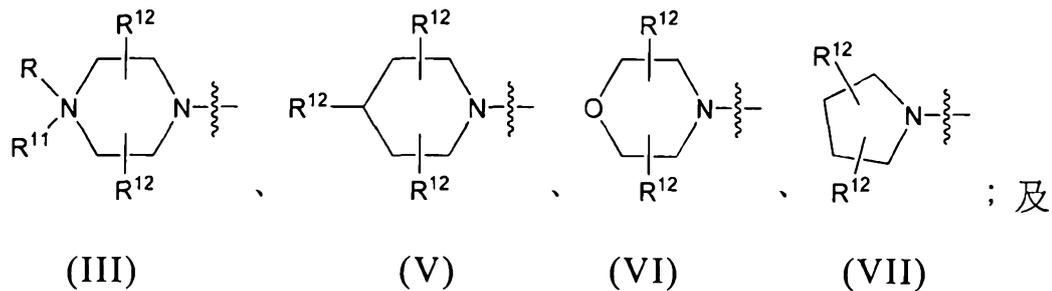
在一些其他實施例中， R^9 為 C_1 - C_{12} 芳烷基。舉例而言，在一些實施例中， R^9 為苄基且該苄基可視情況在其苯環或苄基碳上經取代。就此而言，取代基包括烷基及烷氧基，例如甲基或甲氧基。在一些實施例中，苄基在苄基碳上經甲基取代。舉例而言，在一些實施例中， R^9 具有以下結構(XIV)：



(XIV)。

在其他實施例中， R^9 為芳基。舉例而言，在一些實施例中， R^9 為苯基且該苯基可視情況經取代。就此而言，取代基包括烷基及烷氧

在其他實施例中，雜環為雙環，例如12員雙環雜環。雜環可為哌嗪基。雜環可為嗎啉基。雜環可為哌啶基。雜環可為十氫異喹啉。代表性雜環包括以下：



(VIII)。

在一些實施例中， R^{11} 在每次出現時獨立地為 C_2 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 胺基烷基、芳基、雜芳基或雜環基。

在一些實施例中， R^{11} 為 C_2 - C_{12} 烷基。在一些實施例中， R^{11} 為乙基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_3 烷基。在其他實施例中， R^{11} 為異丙基。在一些其他實施例中， R^{11} 為 C_4 烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_5 烷基。在一些實施例中， R^{11} 為 C_6 烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_7 烷基。在一些實施例中， R^{11} 為 C_8 烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_9 烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_{10} 烷基。在一些其他實施例中， R^{11} 為 C_{11} 烷基。在一些實施例中， R^{11} 為 C_{12} 烷基。

在其他實施例中， R^{11} 為 C_1 - C_{12} 胺基烷基。在一些實施例中， R^{11} 為甲基胺基。在一些實施例中， R^{11} 為乙基胺基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_3 胺基烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_4 胺基烷基。在一些其他實施例中， R^{11} 為 C_5 胺基烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_6 胺基烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_7 胺基烷基。在一些實施例中， R^{11} 為 C_8 胺基

烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_9 胺基烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_{10} 胺基烷基。在一些其他實施例中， R^{11} 為 C_{11} 胺基烷基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_{12} 胺基烷基。

在其他實施例中， R^{11} 為 C_1 - C_{12} 烷基羰基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_1 烷基羰基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_2 烷基羰基。在一些實施例中， R^{11} 為 C_3 烷基羰基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_4 烷基羰基。在一些實施例中， R^{11} 為 C_5 烷基羰基。在一些其他實施例中， R^{11} 為 C_6 烷基羰基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_7 烷基羰基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_8 烷基羰基。在一些實施例中， R^{11} 為 C_9 烷基羰基。在其他實施例中， R^{11} 為 C_{10} 烷基羰基。在一些其他實施例中， R^{11} 為 C_{11} 烷基羰基。在一些實施例中， R^{11} 為 C_{12} 烷基羰基。在其他實施例中， R^{11} 為 $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ ，其中 n 為1至6。舉例而言，在一些實施例中， n 為1。在其他實施例中， n 為2。在其他實施例中， n 為3。在一些其他實施例中， n 為4。在其他實施例中， n 為5。在其他實施例中， n 為6。

在其他實施例中， R^{11} 為芳基。舉例而言，在一些實施例中， R^{11} 為苯基。在一些實施例中，苯基例如經硝基取代。

在其他實施例中， R^{11} 為雜芳基。舉例而言，在一些實施例中， R^{11} 為吡啶基。在其他實施例中， R^{11} 為嘧啶基。

在其他實施例中， R^{11} 為雜環基。舉例而言，在一些實施例中， R^{11} 為哌啶基，例如哌啶-4-基。

在一些實施例中， R^{11} 為乙基、異丙基、哌啶基、嘧啶基、膽酸酯基、去氧膽酸酯基或 $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ ，其中 n 為1至6。

在一些實施例中， R 為電子對。在其他實施例中， R 為氫，且在其他實施例中， R 為 C_1 - C_{12} 烷基。在一些實施例中， R 為甲基。在一些實施例中， R 為乙基。在其他實施例中， R 為 C_3 烷基。在其他實施例中， R 為異丙基。在一些其他實施例中， R 為 C_4 烷基。在其他實施例

中，R為C₅烷基。在一些實施例中，R為C₆烷基。在其他實施例中，R為C₇烷基。在其他實施例中，R為C₈烷基。在其他實施例中，R為C₉烷基。在一些實施例中，R為C₁₀烷基。在其他實施例中，R為C₁₁烷基。在一些實施例中，R為C₁₂烷基。

在一些實施例中，R¹²在每次出現時獨立地為氫、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂胺基烷基、-NH₂、-NR¹³R¹⁴、-NR¹³R¹⁴R¹⁵、側氧基、-CN、三氟甲基、醯胺基、脞基、脞基烷基、脞基烷基羰基、胍基、胍基烷基、胍基烷基羰基、膽酸酯基、去氧膽酸酯基、芳基、雜芳基、雜環、-SR¹³或C₁-C₁₂烷氧基，其中R¹³、R¹⁴及R¹⁵在每次出現時獨立地為C₁-C₁₂烷基。

在一些實施例中，R¹²為氫。在一些實施例中，R¹²為C₁-C₁₂烷基。在一些實施例中，R¹²為C₁-C₁₂胺基烷基。在一些實施例中，R¹²為-NH₂。在一些實施例中，R¹²為-NR¹³R¹⁴。在一些實施例中，R¹²為-NR¹³R¹⁴R¹⁵。在一些實施例中，R¹²為C₁-C₁₂烷基羰基。在一些實施例中，R¹²為側氧基。在一些實施例中，R¹²為-CN。在一些實施例中，R¹²為三氟甲基。在一些實施例中，R¹²為醯胺基。在一些實施例中，R¹²為脞基。在一些實施例中，R¹²為脞基烷基。在一些實施例中，R¹²為脞基烷基羰基。在一些實施例中，R¹²為胍基，例如單甲基胍基或二甲基胍基。在一些實施例中，R¹²為胍基烷基。在一些實施例中，R¹²為脞基烷基羰基。在一些實施例中，R¹²為膽酸酯基。在一些實施例中，R¹²為去氧膽酸酯基。在一些實施例中，R¹²為芳基。在一些實施例中，R¹²為雜芳基。在一些實施例中，R¹²為雜環。在一些實施例中，R¹²為-SR¹³。在一些實施例中，R¹²為C₁-C₁₂烷氧基。在一些實施例中，R¹²為二甲基胺。

在其他實施例中，R¹²為甲基。在其他實施例中，R¹²為乙基。在一些實施例中，R¹²為C₃烷基。在一些實施例中，R¹²為異丙基。在一

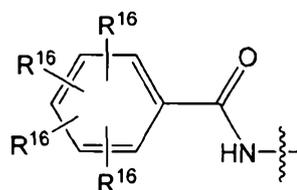
些實施例中， R^{12} 為 C_4 烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_5 烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_6 烷基。在一些其他實施例中， R^{12} 為 C_7 烷基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_8 烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_9 烷基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_{10} 烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_{11} 烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_{12} 烷基。在其他實施例中，烷基部分經一或多個氧原子取代以形成醚部分，例如甲氧基甲基部分。

在一些實施例中， R^{12} 為甲基胺基。在其他實施例中， R^{12} 為乙基胺基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_3 胺基烷基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_4 胺基烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_5 胺基烷基。在一些其他實施例中， R^{12} 為 C_6 胺基烷基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_7 胺基烷基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_8 胺基烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_9 胺基烷基。在一些其他實施例中， R^{12} 為 C_{10} 胺基烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_{11} 胺基烷基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_{12} 胺基烷基。在一些實施例中，胺基烷基為二甲基胺基烷基。

在其他實施例中， R^{12} 為乙醯基。在一些其他實施例中， R^{12} 為 C_2 烷基羰基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_3 烷基羰基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_4 烷基羰基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_5 烷基羰基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_6 烷基羰基。在一些其他實施例中， R^{12} 為 C_7 烷基羰基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_8 烷基羰基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_9 烷基羰基。在一些其他實施例中， R^{12} 為 C_{10} 烷基羰基。在一些實施例中， R^{12} 為 C_{11} 烷基羰基。在其他實施例中， R^{12} 為 C_{12} 烷基羰基。烷基羰基經羧基部分取代，例如烷基羰基經取代以形成丁二酸部分(亦即，3-羧基烷基羰基)。在其他實施例中，烷基羰基經末端-SH基團取代。

在一些實施例中， R^{12} 為醯胺基。在一些實施例中，醯胺基包含進一步例如經-SH、胺基甲酸酯基或其組合取代之烷基部分。在其他實施例中，醯胺基經芳基部分(例如苯基)取代。在某些實施例中， R^{12}

可具有以下結構(IX)：



(IX)

其中R¹⁶在每次出現時獨立地為氫、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂烷氧基、-CN、芳基或雜芳基。

在一些實施例中，R¹²為甲氧基。在其他實施例中，R¹²為乙氧基。在其他實施例中，R¹²為C₃烷氧基。在一些實施例中，R¹²為C₄烷氧基。在一些實施例中，R¹²為C₅烷氧基。在一些其他實施例中，R¹²為C₆烷氧基。在其他實施例中，R¹²為C₇烷氧基。在一些其他實施例中，R¹²為C₈烷氧基。在一些實施例中，R¹²為C₉烷氧基。在其他實施例中，R¹²為C₁₀烷氧基。在一些實施例中，R¹²為C₁₁烷氧基。在其他實施例中，R¹²為C₁₂烷氧基。

在某些實施例中，R¹²為吡咯啶基，例如吡咯啶-1-基。在其他實施例中，R¹²為哌啶基，例如哌啶-1-基或哌啶-4-基。在其他實施例中，R¹²為嗎啉基，例如嗎啉-4-基。在其他實施例中，R¹²為苯基，且在其他實施例中，苯基例如經硝基取代。在其他實施例中，R¹²為嘧啶基，例如嘧啶-2-基。

在其他實施例中，R¹³、R¹⁴及R¹⁵在每次出現時獨立地為C₁-C₁₂烷基。在一些實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為甲基。在其他實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為乙基。在其他實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為C₃烷基。在其他實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為異丙基。在其他實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為C₄烷基。在一些實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為C₅烷基。在一些其他實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為C₆烷基。在其他實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為C₇烷基。在其他實施例中，R¹³、R¹⁴或R¹⁵為C₈烷基。在其他

實施例中， R^{13} 、 R^{14} 或 R^{15} 為 C_9 烷基。在一些實施例中， R^{13} 、 R^{14} 或 R^{15} 為 C_{10} 烷基。在一些實施例中， R^{13} 、 R^{14} 或 R^{15} 為 C_{11} 烷基。在其他實施例中， R^{13} 、 R^{14} 或 R^{15} 為 C_{12} 烷基。

如上文所述，在一些實施例中， R^{12} 為經芳基部分取代之醯胺基。就此而言，每次出現之 R^{16} 可相同或不同。在此等實施例中之某些實施例中， R^{16} 為氫。在其他實施例中， R^{16} 為-CN。在其他實施例中， R^{16} 為雜芳基，例如四唑基。在某些其他實施例中， R^{16} 為甲氧基。在其他實施例中， R^{16} 為芳基，且該芳基視情況經取代。就此而言，視情況存在之取代基包括： C_1 - C_{12} 烷基； C_1 - C_{12} 烷氧基，例如甲氧基、三氟甲氧基；鹵基，例如氯；及三氟甲基。

在其他實施例中， R^{16} 為甲基。在其他實施例中， R^{16} 為乙基。在一些實施例中， R^{16} 為 C_3 烷基。在一些其他實施例中， R^{16} 為異丙基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_4 烷基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_5 烷基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_6 烷基。在一些其他實施例中， R^{16} 為 C_7 烷基。在一些實施例中， R^{16} 為 C_8 烷基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_9 烷基。在一些其他實施例中， R^{16} 為 C_{10} 烷基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_{11} 烷基。在一些其他實施例中， R^{16} 為 C_{12} 烷基。

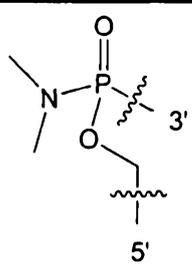
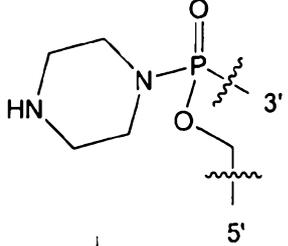
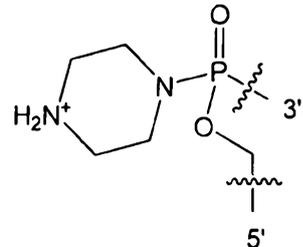
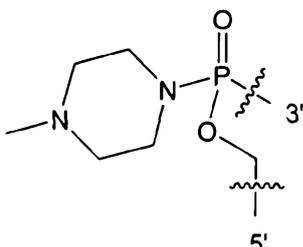
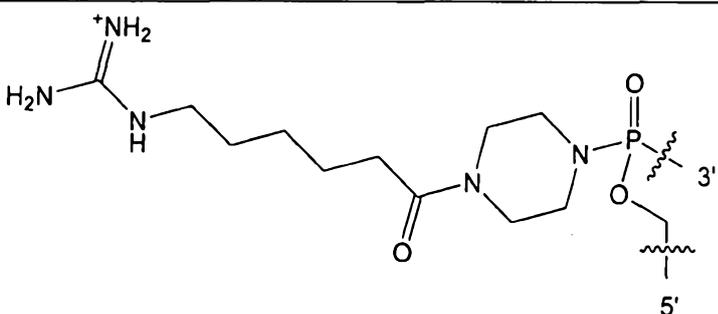
在一些實施例中， R^{16} 為甲氧基。在一些實施例中， R^{16} 為乙氧基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_3 烷氧基。在一些其他實施例中， R^{16} 為 C_4 烷氧基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_5 烷氧基。在一些其他實施例中， R^{16} 為 C_6 烷氧基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_7 烷氧基。在一些其他實施例中， R^{16} 為 C_8 烷氧基。在其他實施例中， R^{16} 為 C_9 烷氧基。在一些其他實施例中， R^{16} 為 C_{10} 烷氧基。在一些實施例中， R^{16} 為 C_{11} 烷氧基。在一些其他實施例中， R^{16} 為 C_{12} 烷氧基。

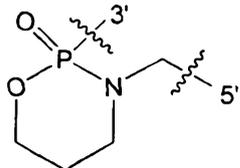
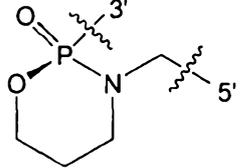
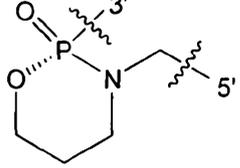
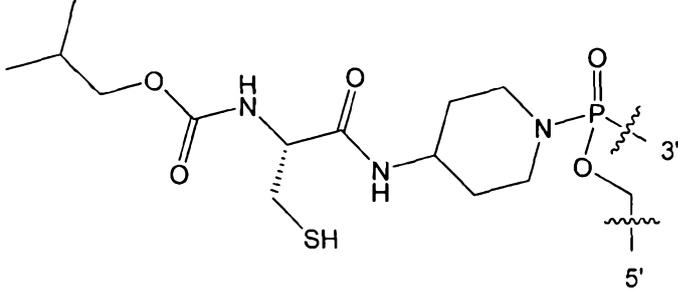
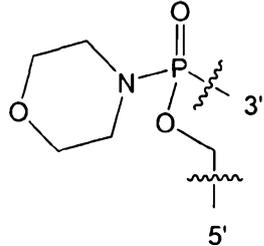
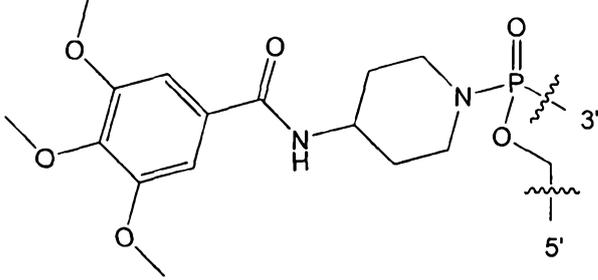
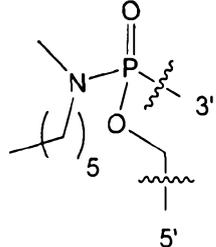
在一些其他實施例中， R^8 與 R^9 接合形成12-18員冠醚。舉例而言，在一些實施例中，冠醚為18員，且在其他實施例中，冠醚為15

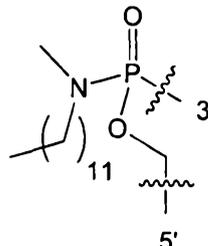
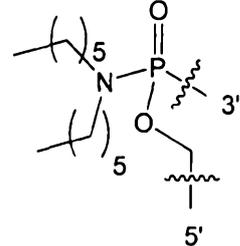
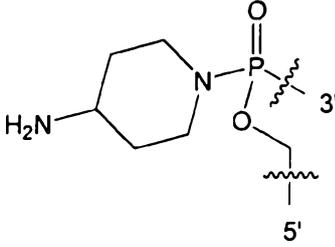
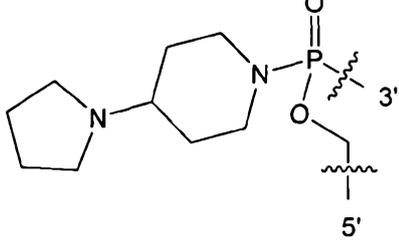
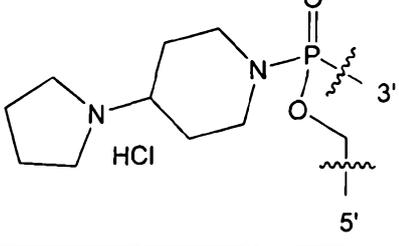
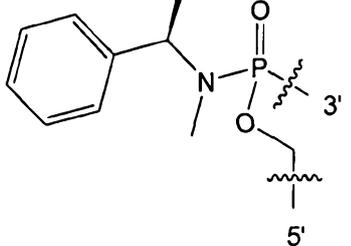
實例包括B56及B55。

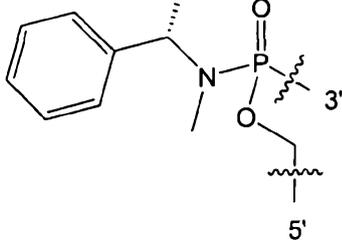
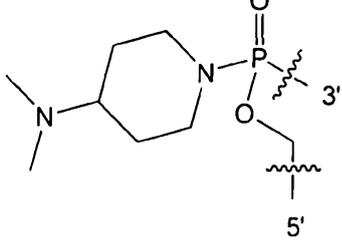
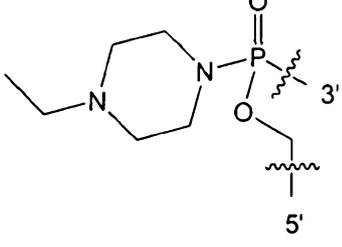
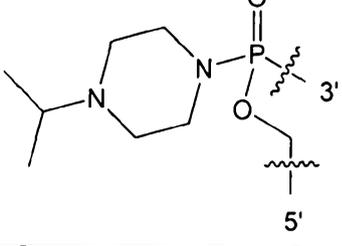
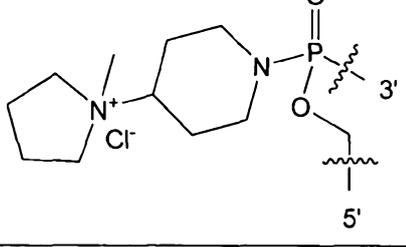
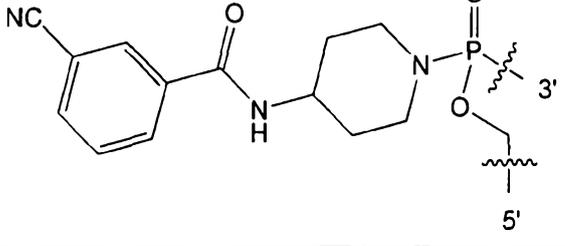
在某些實施例中，連結(B)不具有結構A1-A5中之任一者。表1展示代表性(A)型及(B)型連結。

表1. 代表性單元間連結

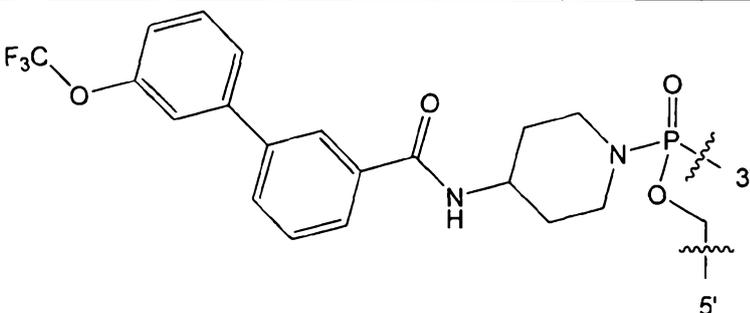
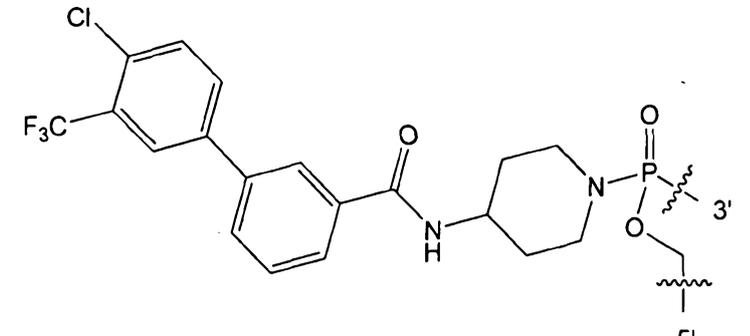
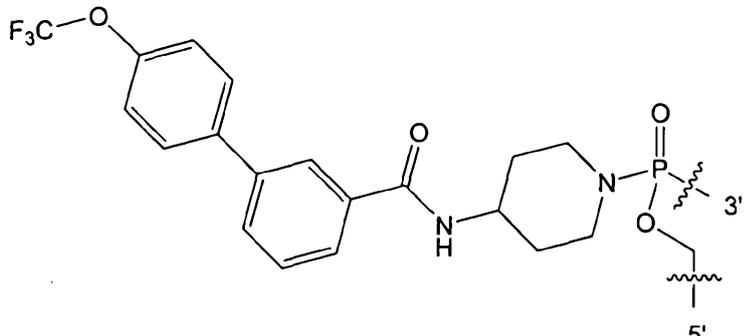
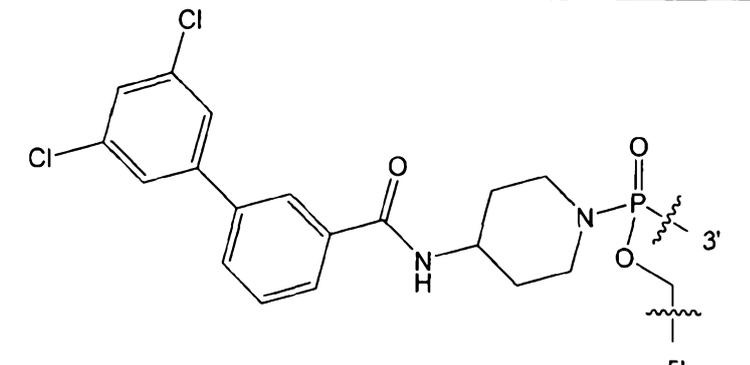
編號	名稱	結構
A1	PMO	
A2	PMO ⁺ (描繪未質子化形式)	
A3	PMO ⁺ (+)	
A4	PMO ^{mepip} (m+)	
A5	PMO ^{GUX}	

編號	名稱	結構
B1	PMO ^{CP}	
B2	PMO ^{cps}	
B3	PMO ^{cpr}	
B4	PMO ^{Shc}	
B5	PMO ^{嗎啡基} (m)	
B6	PMO ^{tri} (t)	
B7	PMO ^{hex} (h)	

編號	名稱	結構
B8	PMO ^{dodec}	
B9	PMO ^{dihex}	
B10	PMO ^{apn} (a)	
B11	PMO ^{pyr} (p)	
B12	PMO ^{pyr} (鹽酸鹽)	
B13	PMO ^{rba}	

編號	名稱	結構
B14	PMO ^{sba}	
B15	PMO ^{dimethylapn}	
B16	PMO ^{etpip}	
B17	PMO ^{iprpip}	
B18	PMO ^{pyrQMe}	
B19	PMO ^{cb}	

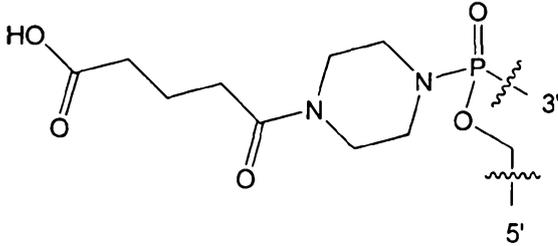
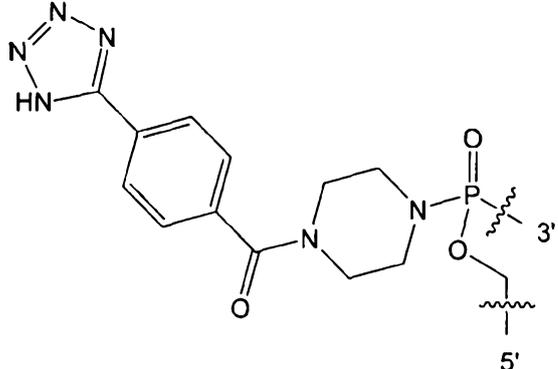
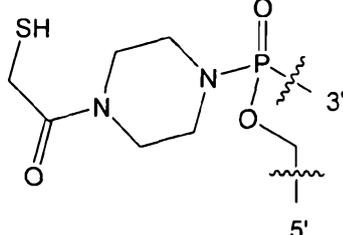
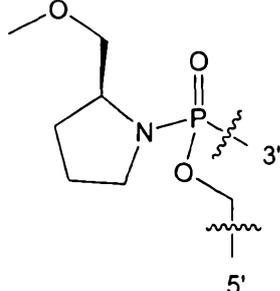
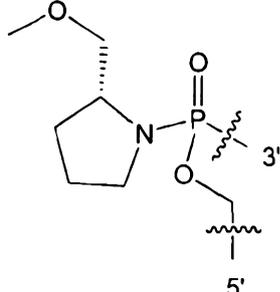
編號	名稱	結構
B20	PMO ^{ma}	
B21	PMO ^{bu}	
B22	PMO ^{bi}	
B23	PMO ^{pip}	
B24	PMO ^{odmb}	

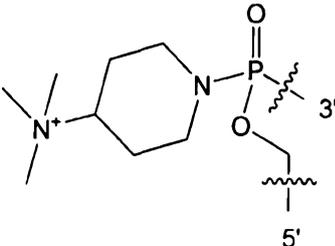
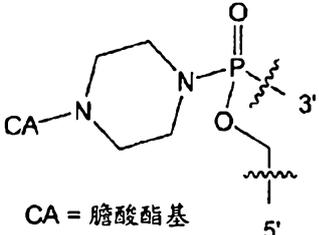
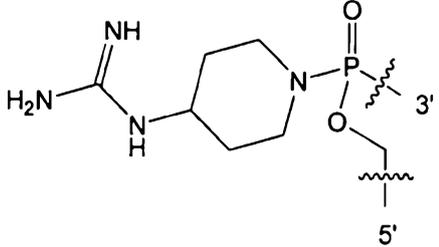
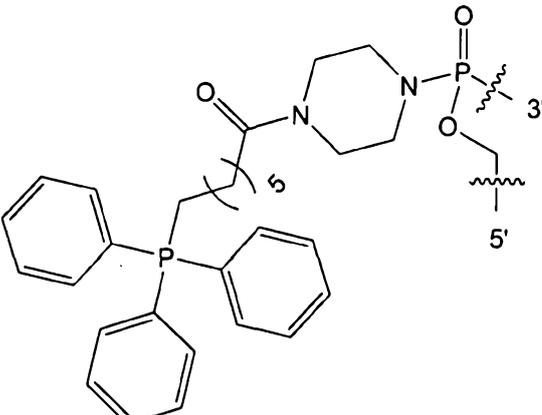
編號	名稱	結構
B25	PMO ^{tfb}	
B26	PMO ^{ctfb}	
B27	PMO ^{ptfb}	
B28	PMO ^{dcb}	

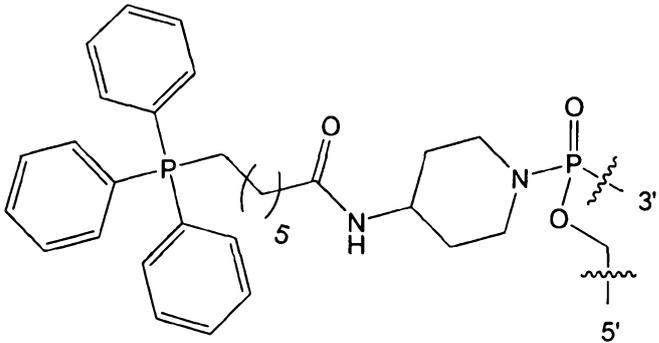
編號	名稱	結構
B29	PMO ^{dmb}	
B30	PMO ^{hy}	
B31	PMO ^{6ce}	
B32	PMO ^b	
B33	PMO ^q	

編號	名稱	結構
B34	PMO ^{npp}	
B35	PMO ^o	
B36	PMO ^{4ce}	
B37	PMO ^{5ce}	
B38	PMO ^{f3p}	
B39	PMO ^{cyp}	

編號	名稱	結構
B40	PMO ^{mop}	
B41	PMO ^{pp}	
B42	PMO ^{dmepip}	
B43	PMO ^{NPpip}	
B44	PMO ^{bipip}	
B45	PMO ^{suc}	

編號	名稱	結構
46	PMO ^{戊二酸}	
B47	PMO ^{tet}	
B48	PMO ^{硫醇} (SH)	
B49	PMO ^{pros}	
B50	PMO ^{proR}	

編號	名稱	結構
B51	PMO ^{tme}	
B52	PMO ^{ca}	 <p>CA = 膽酸酯基</p>
B53	PMO ^{dca}	 <p>dCA = 膽酸酯基</p>
B54	PMO ^{guan} (g)	
B55	PMO ^{+phos}	

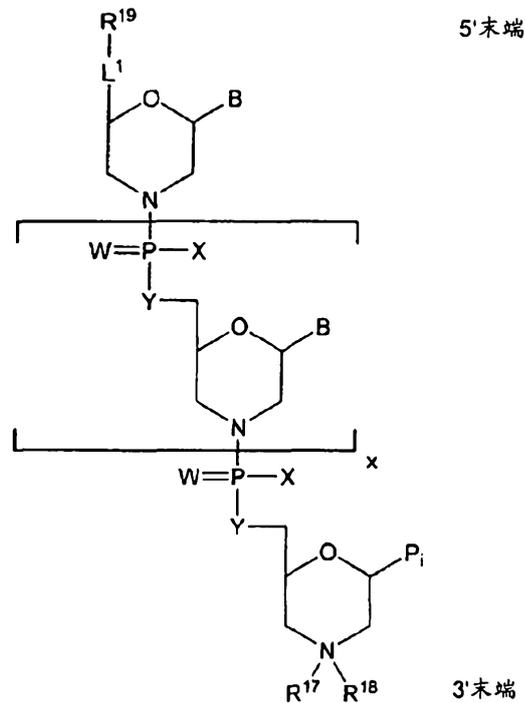
編號	名稱	結構
B56	PMO ^{apnphos}	

在下文之序列及論述中，常使用連結之上述名稱。舉例而言，包含PMO^{apn}連結之鹼基以^{apn}B說明，其中B為鹼基。其他連結以類似方式命名。另外，可使用縮寫名稱，例如，可使用上文圓括號中之縮寫名稱(例如^aB係指^{apn}B)。亦可使用其他可容易鑑別之縮寫。

B. 具有經修飾之末端基團之寡聚物

如上文所述，本發明亦提供一種包含經修飾之末端基團之寡聚物。申請者已發現，以各種化學部分修飾寡聚物之3'及/或5'端為寡聚物提供有益治療特性(例如增強之細胞傳遞、功效及/或組織分佈等)。在多個實施例中，經修飾之末端基團包含疏水性部分，而在其他實施例中，經修飾之末端基團包含親水性部分。經修飾之末端基團可在有或無上述連結之情況下存在。舉例而言，在一些實施例中，寡聚物包含一或多個經修飾之末端基團及(A)型連結，例如其中X為-N(CH₃)₂之連結。在其他實施例中，寡聚物包含一或多個經修飾之末端基團及(B)型連結，例如其中X為4-胺基哌啶-1-基(亦即APN)之連結。在其他實施例中，寡聚物包含一或多個經修飾之末端基團及連結(A)與(B)之混合物。舉例而言，寡聚物可包含一或多個經修飾之末端基團(例如三苯甲基或三苯基乙醯基)及其中X為-N(CH₃)₂之連結與其中X為4-胺基哌啶-1-基之連結。經修飾之末端基團與經修飾之連結的其他組合亦為寡聚物提供有利治療特性。

在一個實施例中，包含末端修飾之寡聚物具有以下結構(XVII)：



(XVII)

或其鹽或異構體，其中X、W及Y如上文關於連結(A)及(B)之任一者所定義；且

R^{17} 在每次出現時獨立地為不存在、氫或 C_1 - C_6 烷基；

R^{18} 及 R^{19} 在每次出現時獨立地為不存在、氫、細胞穿透肽、天然或非天然胺基酸、 C_2 - C_{30} 烷基羰基、 $-C(=O)OR^{21}$ 或 R^{20} ；

R^{20} 在每次出現時獨立地為胍基、雜環基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_6 - C_{30} 芳基、 C_7 - C_{30} 芳烷基、 C_3 - C_{30} 烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基烷基羰基、 C_7 - C_{30} 芳基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基羰基、 C_2 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_3 - C_8 環烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳氧基羰基、 C_8 - C_{30} 芳烷氧基羰基或 $-P(=O)(R^{22})_2$ ；

B為鹼基配對部分；

L^1 為視情況存在之長度為至多18個原子之連結子，其包含選自烷基、羥基、烷氧基、烷基胺基、醯胺、酯、羰基、胺基甲酸酯、磷二醯胺酸、磷醯胺酸、硫代磷酸酯、哌嗪及磷酸二酯之鍵；且

x為0或大於0之整數；且其中 R^{18} 或 R^{19} 中之至少一者為 R^{20} ；且

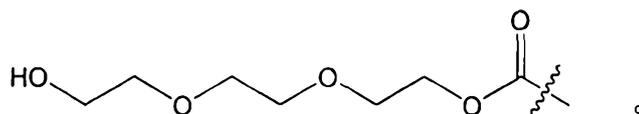
其中 R^{18} 或 R^{19} 中之至少一者為 R^{20} 且其限制條件為 R^{17} 與 R^{18} 兩者均存在。

具有經修飾之末端基團之寡聚物可包含任何數目之(A)型及(B)型連結。舉例而言，寡聚物可僅包含(A)型連結。舉例而言，各連結中之X可為 $-N(CH_3)_2$ 。或者，寡聚物可僅包含連結(B)。在某些實施例中，寡聚物包含連結(A)與(B)之混合物，例如1至4個(B)型連結且其餘連結為(A)型。就此而言，連結包括(但不限於)其中X為胺基哌啶基(對於(B)型)及二甲基胺基(對於(A)型)之連結。

在一些實施例中， R^{17} 不存在。在一些實施例中， R^{17} 為氫。在一些實施例中， R^{17} 為 C_1 - C_6 烷基。在一些實施例中， R^{17} 為甲基。在其他實施例中， R^{17} 為乙基。在一些實施例中， R^{17} 為 C_3 烷基。在一些其他實施例中， R^{17} 為異丙基。在其他實施例中， R^{17} 為 C_4 烷基。在其他實施例中， R^{17} 為 C_5 烷基。在一些其他實施例中， R^{17} 為 C_6 烷基。

在其他實施例中， R^{18} 不存在。在一些實施例中， R^{18} 為氫。在一些實施例中， R^{18} 為如下文更詳細描述之細胞穿透肽。在一些實施例中， R^{18} 為天然或非天然胺基酸，例如三甲基甘胺酸。在一些實施例中， R^{18} 為 R^{20} 。

在其他實施例中， R^{19} 不存在。在一些實施例中， R^{19} 為氫。在一些實施例中， R^{19} 為如下文更詳細描述之細胞穿透肽。在一些實施例中， R^{19} 為天然或非天然胺基酸，例如三甲基甘胺酸。在一些實施例中， R^{19} 為 $-C(=O)OR^{17}$ ，例如， R^{19} 可具有以下結構：



在其他實施例中， R^{18} 或 R^{19} 為 C_2 - C_{30} 烷基羰基，例如 $-C(=O)(CH_2)_nCO_2H$ ，其中n為1至6，例如2。在其他實施例中， R^{18} 或 R^{19} 為乙醯基。

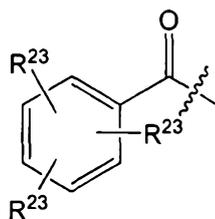
在一些實施例中， R^{20} 在每次出現時獨立地為胍基、雜環基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_6 - C_{30} 芳基、 C_7 - C_{30} 芳烷基、 C_3 - C_{30} 烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基烷基羰基、 C_6 - C_{30} 芳基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基羰基、 C_2 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_3 - C_8 環烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳氧基羰基、 C_8 - C_{30} 芳烷基羰基、 $-C(=O)OR^{21}$ 或 $-P(=O)(R^{22})_2$ ，其中 R^{21} 為包含一或多個氧或羥基部分或其組合之 C_1 - C_{30} 烷基且各 R^{22} 為 C_6 - C_{12} 芳氧基。

在某些其他實施例中， R^{19} 為 $-C(=O)OR^{21}$ ，且 R^{18} 為氫、胍基、雜環基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_6 - C_{30} 芳基、 C_3 - C_{30} 烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基烷基羰基、 C_7 - C_{30} 芳基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基羰基、 C_2 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_3 - C_8 環烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳氧基羰基、 C_8 - C_{30} 芳烷基羰基或 $-P(=O)(R^{22})_2$ ，其中各 R^{22} 為 C_6 - C_{12} 芳氧基。

在其他實施例中， R^{20} 在每次出現時獨立地為胍基、雜環基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_6 - C_{30} 芳基、 C_3 - C_{30} 烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基烷基羰基、 C_7 - C_{30} 芳基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基羰基、 C_2 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_3 - C_8 環烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳氧基羰基、 C_8 - C_{30} 芳烷基羰基或 $-P(=O)(R^{22})_2$ 。而在其他實例中， R^{20} 在每次出現時獨立地為胍基、雜環基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_6 - C_{30} 芳基、 C_7 - C_{30} 芳烷基、 C_3 - C_8 環烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基烷基羰基、 C_7 - C_{30} 芳基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基羰基、 C_2 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_3 - C_8 環烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳氧基羰基、 C_8 - C_{30} 芳烷基羰基或 $-P(=O)(R^{22})_2$ 。

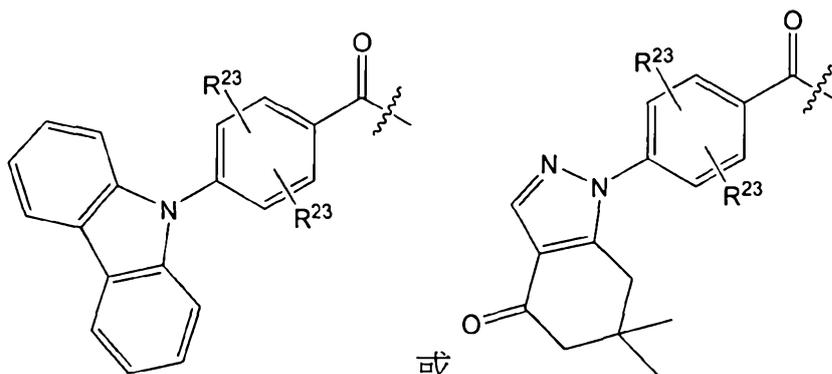
在一些實施例中， R^{20} 為胍基，例如單甲基胍基或二甲基胍基。在其他實施例中， R^{20} 為雜環基。舉例而言，在一些實施例中， R^{20} 為哌啶-4-基。在一些實施例中，哌啶-4-基經三苯甲基或Boc基團取代。在其他實施例中， R^{20} 為 C_3 - C_8 環烷基。在其他實施例中， R^{20} 為 C_6 - C_{30} 芳基。

在一些實施例中， R^{20} 為 C_7 - C_{30} 芳基羰基。舉例而言，在一些實施例中， R^{20} 具有以下結構(XVIII)：



(XVIII)

其中 R^{23} 在每次出現時獨立地為氫、鹵基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_1 - C_{30} 烷氧基、 C_1 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基、芳基、雜芳基、雜環基或雜環烷基，且其中一個 R^{23} 可與另一 R^{23} 接合形成雜環基環。在一些實施例中，至少一個 R^{23} 為氫，舉例而言，在一些實施例中，各 R^{23} 為氫。在其他實施例中，至少一個 R^{23} 為 C_1 - C_{30} 烷氧基，舉例而言，在一些實施例中，各 R^{23} 為甲氧基。在其他實施例中，至少一個 R^{23} 為雜芳基，舉例而言，在一些實施例中，至少一個 R^{23} 具有以下結構(XVIIIa)或(XVIIIb)之一：

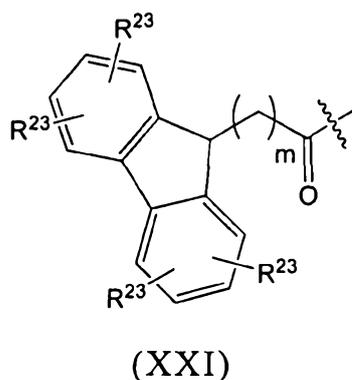
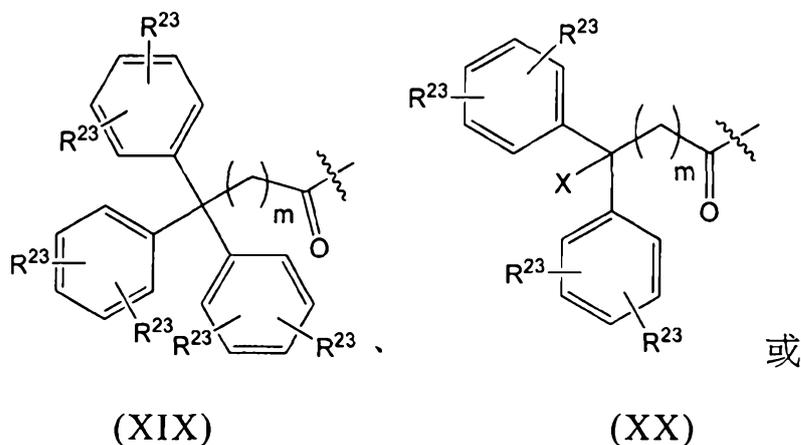


(XVIIIa)

(XVIIIb)。

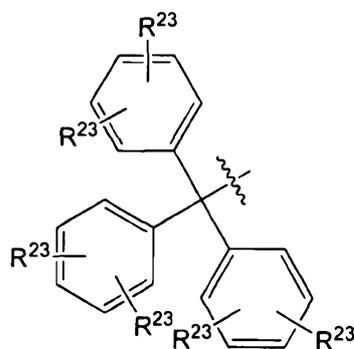
在其他實施例中，一個 R^{23} 與另一 R^{23} 接合形成雜環基環。舉例而言，在一個實施例中， R^{20} 為5-羧基螢光素。

在其他實施例中， R^{20} 為 C_7 - C_{30} 芳烷基羰基。舉例而言，在多個實施例中， R^{20} 具有以下結構(XIX)、(XX)或(XXI)之一：



其中R²³在每次出現時獨立地為氫、鹵基、C₁-C₃₀烷基、C₁-C₃₀烷氧基、C₁-C₃₀烷氧基羰基、C₇-C₃₀芳烷基、芳基、雜芳基、雜環基或雜環烷基，其中一個R²³可與另一R²³接合形成雜環基環，X為-OH或鹵基，且m為0至6之整數。在一些特定實施例中，m為0。在其他實施例中，m為1，而在其他實施例中，m為2。在其他實施例中，至少一個R²³為氫，舉例而言，在一些實施例中，各R²³為氫。在一些實施例中，X為氫。在其他實施例中，X為-OH。在其他實施例中，X為Cl。在其他實施例中，至少一個R²³為C₁-C₃₀烷氧基，例如甲氧基。

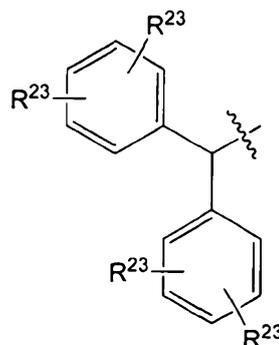
在其他實施例中，R²⁰為C₇-C₃₀芳烷基，例如三苯甲基。在其他實施例中，R²⁰為甲氧基三苯甲基。在一些實施例中，R²⁰具有以下結構(XXII)：



(XXII)

其中 R^{23} 在每次出現時獨立地為氫、鹵基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_1 - C_{30} 烷氧基、 C_1 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基、芳基、雜芳基、雜環基或雜環烷基，且其中一個 R^{23} 可與另一 R^{23} 接合形成雜環基環。舉例而言，在一些實施例中，各 R^{23} 為氫。在其他實施例中，至少一個 R^{23} 為 C_1 - C_{30} 烷氧基，例如甲氧基。

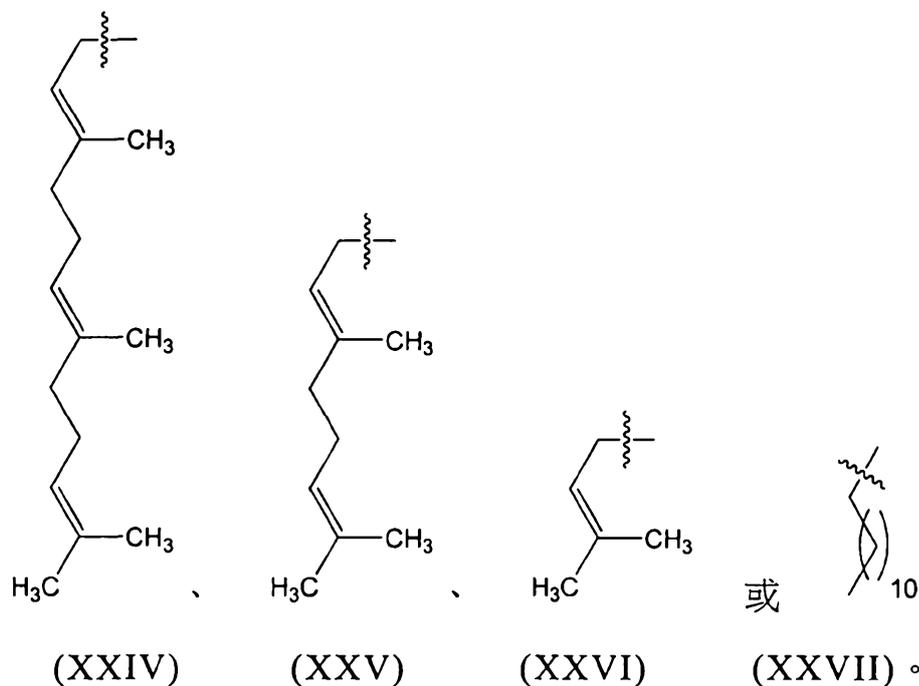
在其他實施例中， R^{20} 為 C_7 - C_{30} 芳烷基且 R^{20} 具有以下結構(XXIII)：



(XXIII)。

在一些實施例中，至少一個 R^{23} 為鹵基，例如氯。在一些其他實施例中，一個 R^{23} 為處於對位之氯。

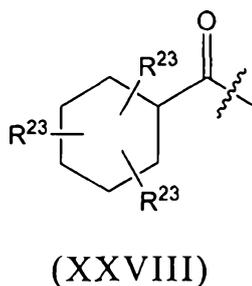
在其他實施例中， R^{20} 為 C_1 - C_{30} 烷基。舉例而言，在一些實施例中， R^{20} 為 C_4 - C_{20} 烷基且視情況包含一或多個雙鍵。舉例而言，在一些實施例中， R^{20} 為包含參鍵(例如末端參鍵)之 C_{4-10} 烷基。在一些實施例中， R^{20} 為己炔-6-基。在一些實施例中， R^{20} 具有以下結構(XXIV)、(XXV)、(XXVI)或(XXVII)之一：



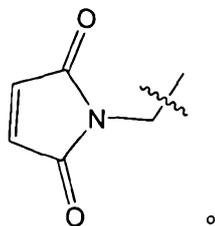
在其他實施例中， R^{20} 為 C_3 - C_{30} 烷基羰基，例如 C_3 - C_{10} 烷基羰基。在一些實施例中， R^{20} 為 $-C(=O)(CH_2)_pSH$ 或 $-C(=O)(CH_2)_pSSHet$ ，其中 p 為1至6之整數且 Het 為雜芳基。舉例而言， p 可為1或 p 可為2。在其他實施例中， Het 為吡啶基，例如吡啶-2-基。在其他實施例中， C_3 - C_{30} 烷基羰基經另一寡聚物取代，舉例而言，在一些實施例中，寡聚物包含位於3'位置處的將該寡聚物與另一寡聚物之3'位置連結之 C_3 - C_{30} 烷基羰基。該等末端修飾包括於本發明之範疇內。

在其他實施例中， R^{20} 為進一步經芳基磷醯基部分(例如三苯基磷醯基)取代之 C_3 - C_{30} 烷基羰基。該等 R^{20} 基團之實例包括表2中之結構33。

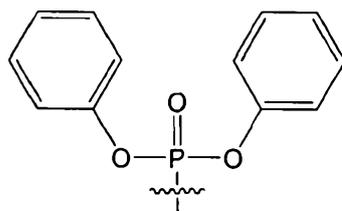
在其他實施例中， R_{20} 為 C_3 - C_8 環烷基羰基，例如 C_5 - C_7 環烷基羰基。在此等實施例中， R_{20} 具有以下結構(XXVIII)：



其中 R^{23} 在每次出現時獨立地為氫、鹵基、 C_1-C_{30} 烷基、 C_1-C_{30} 烷氧基、 C_1-C_{30} 烷氧基羰基、 C_7-C_{30} 芳烷基、芳基、雜芳基、雜環基或雜環烷基，且其中一個 R^{23} 可與另一 R^{23} 接合形成雜環基環。在一些實施例中， R^{23} 為雜環基烷基，舉例而言，在一些實施例中， R^{23} 具有以下結構：



在一些其他實施例中， R^{20} 為 C_3-C_8 環烷基烷基羰基。在其他實施例中， R^{20} 為 C_2-C_{30} 烷氧基羰基。在其他實施例中， R^{20} 為 C_3-C_8 環烷氧基羰基。在其他實施例中， R^{20} 為 C_7-C_{30} 芳氧基羰基。在其他實施例中， R^{20} 為 C_8-C_{30} 芳烷基氧基羰基。在其他實施例中， R^{20} 為 $-P(=O)(R^{22})_2$ ，其中各 R^{22} 為 C_6-C_{12} 芳氧基，舉例而言，在一些實施例中， R^{20} 具有以下結構(C24)：



(C24)。

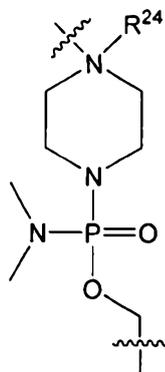
在其他實施例中， R^{20} 包含一或多個鹵原子。舉例而言，在一些實施例中， R^{20} 包含任何上述 R^{20} 部分之全氟類似物。在其他實施例中， R^{20} 為對三氟甲基苯基、三氟甲基三苯甲基、全氟戊基或五氟苯基。

在一些實施例中，3'末端包含修飾，且在其他實施例中，5'末端包含修飾。在其他實施例中，3'末端與5'末端均包含修飾。因此，在一些實施例中， R^{18} 不存在且 R^{19} 為 R^{20} 。在其他實施例中， R^{19} 不存在

且 R^{18} 為 R^{20} 。在其他實施例中， R^{18} 及 R^{19} 各為 R^{20} 。

在一些實施例中，寡聚物除3'或5'修飾以外亦包含細胞穿透肽。因此，在一些實施例中， R^{19} 為細胞穿透肽且 R^{18} 為 R^{20} 。在其他實施例中， R^{18} 為細胞穿透肽且 R^{19} 為 R^{20} 。在前述其他實施例中，細胞穿透肽為富含精胺酸肽。

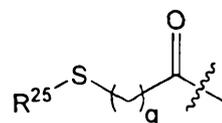
在一些實施例中，將5'末端基團(亦即 R^{19})與寡聚物連結之連結子 L^1 可存在或不存在。連結子包含任何數目之官能基及任何長度，其限制條件為該連結子保持其將5'末端基團與寡聚物連結之能力且其限制條件為該連結子不干擾寡聚物以序列特異性方式結合於標靶序列之能力。在一個實施例中， L 包含磷二鹵胺酸及哌嗪鍵。舉例而言，在一些實施例中， L 具有以下結構(XXIX)：



(XXIX)

其中 R^{24} 為不存在、氫或 C_1 - C_6 烷基。在一些實施例中， R^{24} 不存在。在一些實施例中， R^{24} 為氫。在一些實施例中， R^{24} 為 C_1 - C_6 烷基。在一些實施例中， R^{24} 為甲基。在其他實施例中， R^{24} 為乙基。在其他實施例中， R^{24} 為 C_3 烷基。在一些其他實施例中， R^{24} 為異丙基。在其他實施例中， R^{24} 為 C_4 烷基。在一些實施例中， R^{24} 為 C_5 烷基。在其他實施例中， R^{24} 為 C_6 烷基。

在其他實施例中， R^{20} 為 C_3 - C_{30} 烷基羰基且 R^{20} 具有以下結構(XXX)：



(XXX)

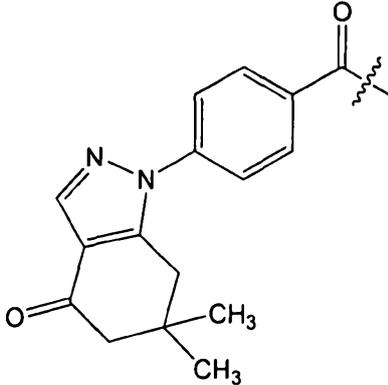
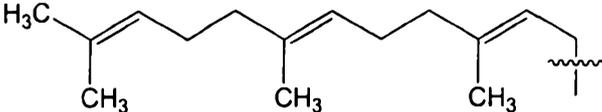
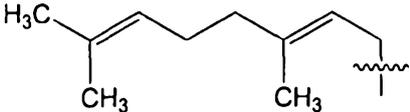
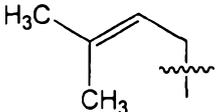
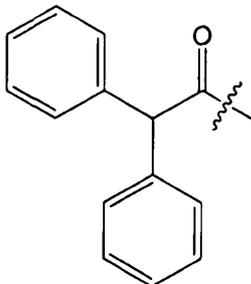
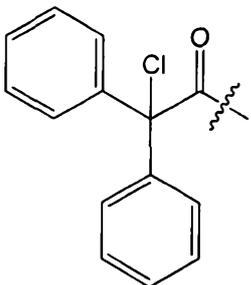
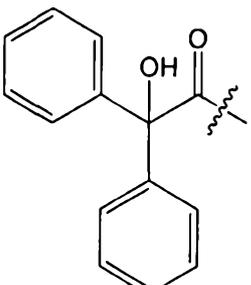
其中 R^{25} 為氫或 $-SR^{26}$ ，其中 R^{26} 為氫、 C_1-C_{30} 烷基、雜環基、芳基或雜芳基，且 q 為0至6之整數。

在任何上述其他實施例中， R^{23} 在每次出現時獨立地為氫、鹵基、 C_1-C_{30} 烷基、 C_1-C_{30} 烷氧基、芳基、雜芳基、雜環基或雜環烷基。

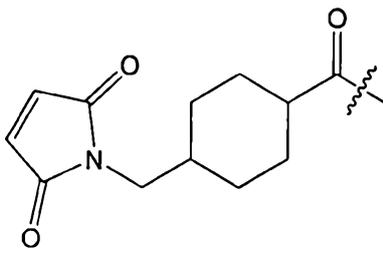
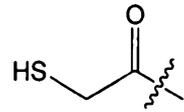
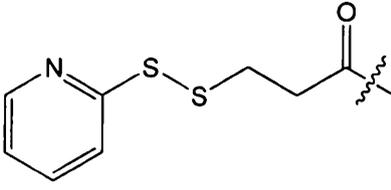
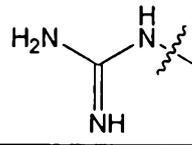
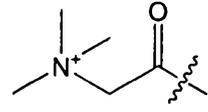
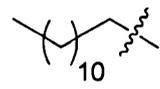
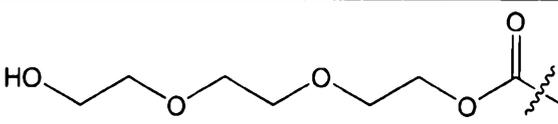
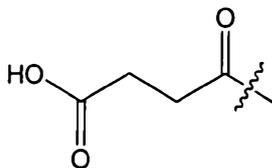
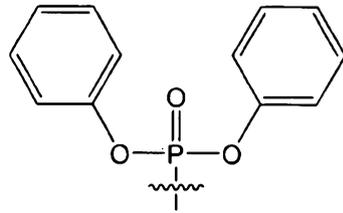
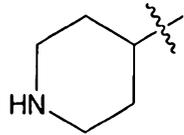
在一些其他實施例中，僅寡聚物之3'末端與上述基團之一結合。在一些其他實施例中，僅寡聚物之5'末端與上述基團之一結合。在其他實施例中，3'末端與5'末端均包含上述基團之一。末端基團可選自上述任一基團或表2中所說明之任何特定基團。

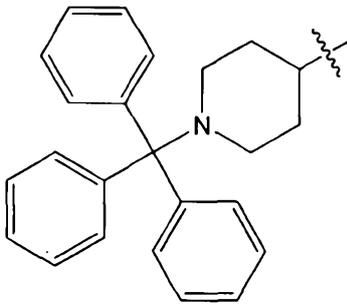
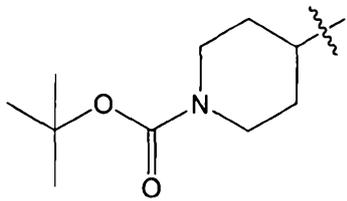
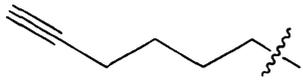
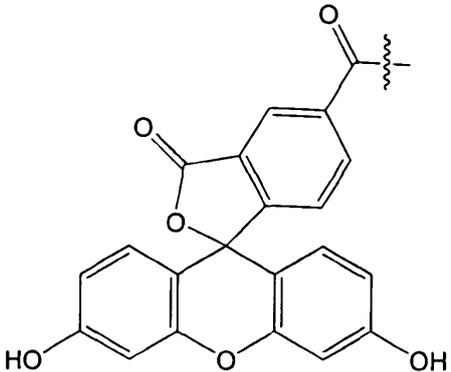
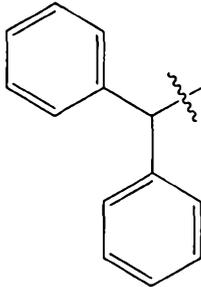
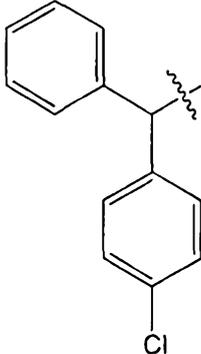
表2. 代表性末端基團

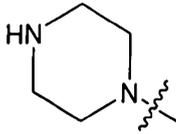
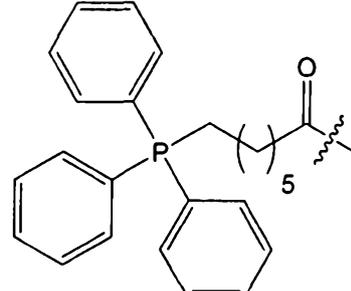
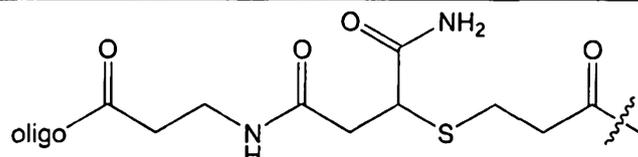
編號	名稱	結構
C1	三甲氧基苄醯基	
C2	9-萘-羧基	
C3	4-咪唑基苄醯基	

編號	名稱	結構
C4	4-吡唑酮基苄醯基	
C5	法呢基(Farnesyl)	
C6	香葉草基(Geranyl)	
C7	異戊二烯基(Prenyl)	
C8	二苯基乙醯基	
C9	氯二苯基乙醯基	
C10	羥基二苯基乙醯基	

編號	名稱	結構
C11	三苯基丙醯基	
C12	三苯基丙基	
C13	三苯基乙醯基	
C14	三苯甲基(Tr)	
C15	甲氧基三苯甲基 (MeOTr)	

編號	名稱	結構
C16	甲基丁二醯亞胺基-環己醯基	
C17	硫乙醯基	
C18	COCH ₂ CH ₂ SSPy	
C19	胍基	
C20	三甲基甘胺酸	
C21	月桂醯基	
C22	三伸乙基乙醇醯基 (EG3)	
C23	丁二酸乙醯基 (Succinicacetyl)	
C24	二苯基磷醯基	
C25	哌啶-4-基	

編號	名稱	結構
C26	三苯甲基哌啶-4-基	
C27	Boc-哌啶-4-基	
C28	己炔-6-基	
C29	5-羧基螢光素	
C30	二苯甲基	
C31	對氯二苯甲基	

編號	名稱	結構
C32	哌嗪基(pip)	
C33	三苯膦基 (Triphenylphos)	
C34	二聚化	 Oligo = 另一寡聚物

1. 肽輸送體

在一些實施例中，本發明寡聚物與有效增強寡聚物輸送至細胞中之肽輸送體部分(例如細胞穿透肽輸送部分)結合。舉例而言，在一些實施例中，肽輸送體部分為富含精胺酸肽。在其他實施例中，輸送部分與寡聚物之5'或3'末端連接，如例如图1C中所示。當該肽與任一末端結合時，相反末端隨後可用於進一步與如本文所述之經修飾之末端基團結合。

在前述一些實施例中，肽輸送部分包含6至16個選自X'單元、Y'單元及Z'單元之單元，

其中：

(a) 各X'單元獨立地表示離胺酸、精胺酸或精胺酸類似物，該類似物為包含結構 $R^{33}N=C(NH_2)R^{34}$ 之側鏈的陽離子性 α -胺基酸，其中 R^{33} 為H或R； R^{34} 為 R^{35} 、 NH_2 、 NHR 或 NR_{34} ，其中 R^{35} 為低碳數烷基或低碳數烯基且可另外包括氧或氮； R^{33} 與 R^{34} 可一起形成環；且側鏈經由 R^{33} 或 R^{34} 與該胺基酸連結；

(b) 各Y'單元獨立地表示中性胺基酸-C(O)-(CHR)_n-NH-，其中n為2至7且各R獨立地為H或甲基；及

(c) 各Z'單元獨立地表示具有中性芳烷基側鏈之 α -胺基酸；

其中肽包含由(X'Y'X')_p、(X'Y')_m及(X'Z'Z')_p之一表示之序列，其中p為2至5且m為2至8。

在所選實施例中，對於各X'而言，側鏈部分為胍基，如在胺基酸單元精胺酸(Arg)中。在其他實施例中，各Y'為-CO-(CH₂)_n-CHR-NH-，其中n為2至7且R為H。舉例而言，當n為5且R為H時，Y'為6-胺基己酸單元，本文中縮寫為Ahx；當n為2且R為H時，Y'為 β -丙胺酸單元。

在某些實施例中，此類型之肽包括包含精胺酸二聚體與單一Y'單元交替之肽，其中Y'為Ahx。實例包括具有式(RY'R)_p或式(RRY')_p之肽，其中Y'為Ahx。在一個實施例中，Y'為6-胺基己酸單元，R為精胺酸且p為4。

在另一實施例中，各Z'為苯丙胺酸，且m為3或4。

在一些實施例中，結合之肽經由連結子Ahx-Bis與寡聚物之末端連結，其中Ahx為6-胺基己酸單元且B為 β -丙胺酸單元。

在所選實施例中，對於各X'而言，側鏈部分係獨立地選自由胍基(HN=C(NH₂)NH-)、脘基(HN=C(NH₂)C-)、2-胺基二氫嘧啶基、2-胺基四氫嘧啶基、2-胺基吡啶基及2-胺基嘧啶酮基組成之群，且其較佳選自胍基及脘基。在一個實施例中，側鏈部分為胍基，如在胺基酸單元精胺酸(Arg)中。

在一些實施例中，Y'單元為相連的，亦即Y'單元之間無X'單元插入；或Y'單元個別地散佈於X'單元之間。然而，在一些實施例中，連結單元可介於Y'單元之間。在一個實施例中，Y'單元處於肽輸送體之末端；在其他實施例中，其由X'單元側接。在其他實施例中，各Y'為-CO-(CH₂)_n-CHR-NH-，其中n為2至7且R為H。舉例而言，當n為5且R

為H時，Y'為6-胺基己酸單元，本文中縮寫為Ahx。在此群組之所選實施例中，各X'包含胍基側鏈部分，如在精胺酸單元中。此類型之例示性肽包括包含精胺酸二聚體與單一Y'單元交替之肽，其中Y'較佳為Ahx。實例包括具有式(RY'R)₄或式(RRY')₄之肽，其中Y'較佳為Ahx。在一些實施例中，核酸類似物較佳在C-末端與末端Y'單元連結，如例如图1C中所示。在其他實施例中，連結子具有結構AhxB，其中Ahx為6-胺基己酸單元且B為β-丙胺酸單元。

如上文所述之肽輸送部分已顯示相對於在不存在經連接輸送部分之情況下寡聚物的吸收且相對於由缺乏疏水性單元Y'之經連接輸送部分進行的吸收，大大增強經連接寡聚物進入細胞。該吸收增強可藉由化合物至哺乳動物細胞中之吸收相對於由缺乏疏水性單元Y'之經連接輸送部分對藥劑之吸收增加至少增加兩倍，或在其他實施例中增加四倍來證實。在一些實施例中，吸收相對於未經結合化合物增強至少二十倍或至少四十倍。

肽輸送部分之另一益處在於使反義寡聚物與其標靶核酸序列之間的雙螺旋穩定之預期能力。在不欲受理論束縛下，此肽輸送部分使雙螺旋穩定之能力可由帶正電荷之輸送部分與帶負電荷之核酸之間的靜電相互作用而產生。在一些實施例中，輸送體中帶電荷單元之數目少於14，如上文所述，或在其他實施例中介於8與11之間，此係因為帶電荷單元之數目過高可能導致序列特異性降低之故。

包含連結子(B或AhxB)之例示性富含精胺酸細胞穿透肽輸送體提供於下表3中：

表3. 富含精胺酸細胞穿透肽輸送體

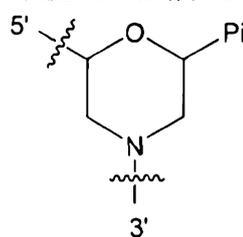
名稱(命名)	序列	SEQ ID NO. ^a
rTAT	RRRQRRKKR	56
Tat	RKKRRQRRR	57

R ₉ F ₂	RRRRRRRRFF	58
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRFFRRRR	59
R ₄	RRRR	60
R ₅	RRRRR	61
R ₆	RRRRRR	62
R ₇	RRRRRRR	63
R ₈	RRRRRRRR	64
R ₉	RRRRRRRRR	65
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	66
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	67
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	68
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRFFC	69
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRGRFFC	70

^a指定為 SEQ ID NO 之序列不包括連結部分(例如 C、G、Ahx、B、AhxB，其中 Ahx 及 B 分別指代 6-胺基己酸及 β-丙胺酸)。

C. 寡聚物之特性

如上文所述，本發明係有關包含賦予寡聚物所需特性(例如增加之反義活性)之各種修飾的寡聚物。在某些實施例中，寡聚物包含主鏈，該主鏈包含由單元間連結接合之嗎啉基環結構之序列，該等單元間連結使一個嗎啉基環結構之 3' 端與相鄰嗎啉基環結構之 5' 端接合，其中各嗎啉基環結構結合於鹼基配對部分，使得該寡聚物可依序列特异性方式結合於標靶核酸。嗎啉基環結構可具有以下結構(i)：



(i)

其中 B 在每次出現時獨立地為鹼基配對部分。

各嗎啉基環結構載有鹼基配對部分(Pi)，以形成通常旨在與細胞中或所治療個體中之所選反義標靶雜交的鹼基配對部分之序列。鹼基

配對部分可為原生DNA或RNA中所見之嘌呤或嘧啶(A、G、C、T或U)或類似物，諸如次黃嘌呤(核苷肌苷之鹼基組分)或5-甲基胞嘧啶。亦可利用賦予寡聚物改良之結合親和力的類似鹼基。就此而言，例示性類似物包括經C5-丙炔基修飾之嘧啶、9-(胺基乙氧基)啡噁嗪(G形鉗，G-clamp)及其類似物。

如上文所述，寡聚物可根據本發明之一個態樣加以修飾以包括一或多個(B)連結，例如每2-5個不帶電荷連結至多約1個，通常每10個不帶電荷連結有3-5個。某些實施例亦包括一或多個(B)型連結。當至多約一半之主鏈連結為(B)型時，觀察到反義活性之最佳改良。通常在少量(例如10%-20%)(B)連結下觀察到一些而非最大增強。

在一個實施例中，(A)型及(B)型連結沿著主鏈散佈。在一些實施例中，寡聚物沿著其整個長度並不具有(A)連結與(B)連結之嚴格交替圖案。寡聚物可視情況包含如上文所述之5'及/或3'修飾。

亦考慮具有(A)連結嵌段及(B)連結嵌段之寡聚物；舉例而言，(A)連結之中心嵌段可由(B)連結嵌段側接，或(B)連結之中心嵌段可由(A)連結嵌段側接。在一個實施例中，寡聚物具有大致等長之5'、3'及中心區域，且中心區域中(B)或(A)連結之百分比大於約50%，或大於約70%。用於反義應用中之寡聚物的長度一般在約10至約40個單元、更佳約15至25個單元之範圍內。舉例而言，具有19-20個單元(反義寡聚物之適用長度)之本發明寡聚物可理想地具有2至7個，例如4至6個或3至5個(B)連結，且其餘為(A)連結。具有14-15個單元之寡聚物可理想地具有2至5個，例如3或4個(B)連結，且其餘為(A)連結。

如下文進一步描述，嗎啉基單元亦可由基於非磷之單元間連結相連結，其中至少一個連結為連結(B)。

亦可使用其他寡核苷酸類似物連結，其在未經修飾狀態下不帶電荷，但亦可帶有側位胺取代基。舉例而言，嗎啉基環上之5'氮原子

可用於磺醯胺連結(或脲連結，其中磷分別經碳或硫置換)中。

在反義應用之一些實施例中，寡聚物可與核酸標靶序列100%互補，或其可包括錯配以例如容納變異體，只要寡聚物與核酸標靶序列之間形成的異雙螺旋足夠穩定而經受住細胞核酸酶作用及可在活體內發生之其他降解模式即可。錯配若存在，則其對雜交雙螺旋之末端區域比對中間區域之失穩作用小。根據充分瞭解之雙螺旋穩定性原理，所允許之錯配數目將取決於寡聚物之長度、雙螺旋中G:C鹼基對之百分比及雙螺旋中錯配之位置。儘管此種反義寡聚物未必與核酸標靶序列100%互補，但其有效穩定且特異性地結合於標靶序列，從而調節核酸標靶之生物活性，例如經編碼蛋白質之表現。

寡聚物與標靶序列之間形成的雙螺旋之穩定性隨著結合 T_m 及雙螺旋對細胞酶促裂解之易感性而變。反義化合物關於互補序列RNA之 T_m 可由習知方法來量測，諸如 Hames 等人，*Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, 第107-108頁所述或如Miyada C.G.及Wallace R.B., 1987, *Oligonucleotide hybridization techniques, Methods Enzymol.* 第154卷，第94-107頁所述之方法。

在一些實施例中，各反義寡聚物關於互補序列RNA之結合 T_m 高於體溫，或在其他實施例中高於 50°C 。在其他實施例中， T_m 在 $60-80^{\circ}\text{C}$ 之範圍內或高於 80°C 。根據熟知原理，可藉由增加雙螺旋中C:G配對鹼基之比率及/或藉由增加異雙螺旋之長度(在鹼基對中)來增加寡聚物化合物關於基於互補之RNA雜交體的 T_m 。同時，出於優化細胞吸收之目的，宜限制寡聚物之大小。為此原因，在長度為20個鹼基或少於20個鹼基下展示高 T_m (50°C 或 50°C 以上)之化合物一般優於對於高 T_m 而言需要多於20個鹼基之化合物。對於一些應用，較長寡聚物(例如長於20個鹼基)可具有某些優勢。舉例而言，在某些實施例中，較長寡聚物可尤其適用於外顯子跳越(skipping)或剪接調節。

靶向序列鹼基可為常規DNA鹼基或其類似物，例如能夠與標靶序列RNA鹼基進行沃森-克里克鹼基配對之尿嘧啶及肌苷。

當標靶核苷酸為尿嘧啶殘基時，寡聚物亦可併有鳥嘌呤鹼基替代腺嘌呤。當標靶序列在不同病毒物種間變化且任何特定核苷酸殘基處之變化為胞嘧啶或尿嘧啶時，此情況適用。藉由在靶向寡聚物中之可變位置處利用鳥嘌呤，可開發鳥嘌呤與尿嘧啶進行鹼基配對(稱作C/U:G鹼基配對)之熟知能力。藉由在此等位置處併入鳥嘌呤，單一寡聚物可有效地靶向更廣泛範圍之RNA標靶可變性。

化合物(例如寡聚物、單元間連結、末端基團)可以不同異構形式存在，例如結構異構體(例如互變異構體)。關於立體異構體，化合物可具有對掌性中心且可呈外消旋體、對映異構性增濃之混合物、個別對映異構體、混合物或非對映異構體或個別非對映異構體形式。所有該等異構形式皆包括於本發明中，包括其混合物。化合物亦可具有可產生滯轉異構體之軸向對掌性。此外，化合物之一些結晶形式可以多晶型物形式存在，其包括於本發明中。另外，一些化合物亦可與水或其他有機溶劑形成溶劑合物。該等溶劑合物類似地包括於本發明之範疇內。

本文所述之寡聚物可用於抑制蛋白質產生或病毒複製之方法中。因此，在一個實施例中，使編碼此種蛋白質之核酸暴露於如本文所揭示之寡聚物。在前述其他實施例中，反義寡聚物包含如本文所揭示之經修飾之5'或3'末端基團或其組合，且鹼基配對部分B形成在有效抑制蛋白質產生之位置處與一部分核酸有效雜交之序列。在一個實施例中，位置為mRNA之ATG起始密碼子區域、前mRNA之剪接位點、或病毒標靶序列，如下文所述。

在一個實施例中，寡聚物關於結合於標靶序列之 T_m 高於約50°C，且其由哺乳動物細胞或細菌細胞吸收。在另一實施例中，寡聚物

可與如本文所述之輸送部分(例如富含精胺酸肽)結合以促進該吸收。在另一實施例中，本文所述之末端修飾可發揮輸送部分之功能以促進由哺乳動物及/或細菌細胞吸收。

嗎啉基寡聚物之製備及特性更詳細地描述於下文及美國專利第5,185,444號及WO/2009/064471中，各文獻藉此以全文引用的方式併入。

D. 寡聚物之調配與投藥

本發明亦提供所揭示寡聚物之調配與傳遞。因此，在一個實施例中，本發明係有關一種包含如本文所揭示之寡聚物及醫藥學上可接受之媒劑的組合物。

反義寡聚物有效傳遞至標靶核酸為治療之一個重要方面。反義寡聚物傳遞之途徑包括(但不限於)各種全身途徑，包括經口及非經腸途徑，例如靜脈內、皮下、腹膜內及肌肉內，以及吸入、經皮及局部傳遞。適當途徑可由熟習此項技術者確定，以適於治療中個體之病況。舉例而言，在治療皮膚病毒感染中反義寡聚物之適當傳遞途徑為局部傳遞，而用於治療病毒呼吸道感染之反義寡聚物係藉由吸入傳遞。寡聚物亦可直接傳遞至病毒感染部位，或傳遞至血流中。

反義寡聚物可於生理學上及/或醫藥學上可接受之任何適宜媒劑中投與。此種組合物可包括一般技術者所採用之多種醫藥學上可接受之標準載劑中之任一者。實例包括(但不限於)鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、水、乙醇水溶液、乳液(諸如油/水乳液或三酸甘油酯乳液)、錠劑及膠囊。生理學上可接受之適合載劑的選擇將視所選投藥模式而變。

本發明之化合物(例如寡聚物)一般可以游離酸或游離鹼之形式利用。或者，本發明之化合物可以酸加成鹽或鹼加成鹽之形式使用。本發明之游離胺基化合物之酸加成鹽可藉由此項技術中熟知之方法製

備，且可由有機酸及無機酸形成。適合之有機酸包括順丁烯二酸、反丁烯二酸、苯甲酸、抗壞血酸、丁二酸、甲烷磺酸、乙酸、三氟乙酸、草酸、丙酸、酒石酸、水楊酸、檸檬酸、葡糖酸、乳酸、杏仁酸、肉桂酸、天冬胺酸、硬脂酸、棕櫚酸、乙醇酸、麩胺酸及苯磺酸。適合之無機酸包括鹽酸、氫溴酸、硫酸、磷酸及硝酸。鹼加成鹽包括與羧酸根陰離子形成之鹽且包括與有機及無機陽離子形成之鹽，該等陽離子為諸如選自鹼金屬及鹼土金屬(例如鋰、鈉、鉀、鎂、鋇及鈣)以及銨離子及其經取代之衍生物(例如二苄基銨、苄基銨、2-羥基乙基銨及其類似物)之陽離子。因此，術語結構(I)之「醫藥學上可接受之鹽」欲涵蓋任何及所有可接受之鹽形式。

另外，前藥亦包括於本發明之內容中。前藥為當將該前藥投與患者時在活體內釋放結構(I)之化合物的任何共價鍵結之載劑。前藥一般藉由修飾官能基來製備，該方式使得藉由常規操作或在活體內使修飾發生裂解，得到母體化合物。前藥包括例如其中羥基、胺基或氫硫基與當投與患者時裂解形成羥基、胺基或氫硫基之任何基團鍵結的本發明化合物。因此，前藥之代表性實例包括(但不限於)結構(I)之化合物之醇及胺官能基的乙酸鹽、甲酸鹽及苯甲酸鹽衍生物。此外，在羧酸(-COOH)之情況下，可採用酯類，諸如甲酯、乙酯及其類似物。

在某些情況下，可採用脂質體來促進反義寡核苷酸吸收至細胞中。(參見例如Williams, S.A., *Leukemia* 10(12): 1980-1989, 1996 ; Lappalainen 等人, *Antiviral Res.* 23:119, 1994 ; Uhlmann 等人, antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle, *Chemical Reviews*, 第90卷, 第4期, 第544-584頁, 1990 ; Gregoriadis, G., 第14章, *Liposome, Drug Carriers in Biology and Medicine*, 第287-341頁, Academic Press, 1979。)亦可使用水凝膠作為投與反義寡聚物之媒劑，例如，如WO 93/01286中所述。或者，寡核苷酸可於微球體或

微粒中投與。(參見例如Wu, G.Y.及Wu, C.H., J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987。)或者，與反義寡聚物複合之氣體填充微泡的使用可增強傳遞至標靶組織，如美國專利第6,245,747號中所述。亦可使用持續釋放組合物。此等組合物可包括呈成形物品(諸如薄膜或微囊)形式之半滲透性聚合基質。

在一個實施例中，反義抑制係藉由使受病毒感染之細胞與有效抑制特異性病毒複製之反義藥劑接觸來有效治療宿主動物之病毒感染。將反義藥劑於適合之醫藥載劑中投與受特定病毒感染之哺乳動物個體，例如人類或家畜。預期反義寡核苷酸遏止RNA病毒在宿主中生長。可在對宿主之正常生長或發育產生極少或無有害影響之情況下減少RNA病毒之數目或消除RNA病毒。

在該方法之一個態樣中，個體為人類個體，例如診斷有局部或全身病毒感染之患者。患者之病況亦可指示本發明之反義寡聚物的預防性投藥，例如，在患者(1)免疫功能不全，(2)為燒傷受難者，(3)具有留置導管，或(4)將要進行或近期已進行手術之情況下。在一個較佳實施例中，寡聚物為含於醫藥學上可接受之載劑中的磷二醯胺酸嗎啉基寡聚物，且其經口傳遞。在另一較佳實施例中，寡聚物為含於醫藥學上可接受之載劑中的磷二醯胺酸嗎啉基寡聚物，且其經靜脈內(i.v.)傳遞。

在該方法之另一應用中，個體為家畜動物，例如家雞、火雞、豬、乳牛或山羊等，且治療為預防性或治療性的。本發明亦包括含有補充有低於治療量之上文所述類型之抗病毒反義化合物的食物穀粒之家畜及家禽食物組合物。亦預期，在以補充有低於治療量之抗病毒劑的食物穀粒飼養家畜及家禽之方法中，以低於治療量之如上文所述之抗病毒寡核苷酸組合物補充食物顆粒取得改良。

在一個實施例中，以有效產生至少200-400 nM反義寡聚物之峰值

血液濃度之量及方式投與反義化合物。通常投與反義寡聚物之一或多次劑量，一般以規則時間間隔，歷時約一週至兩週之時段。經口投藥之較佳劑量為每70公斤約1-1000毫克寡聚物。在一些情況下，針對每個患者之劑量可能必需大於1000毫克寡聚物。對於靜脈內投藥，較佳劑量為每70公斤約0.5毫克至1000毫克寡聚物。可依規則時間間隔投與反義寡聚物，歷時較短時段，例如每天投與歷時兩週或短於兩週。然而，在一些情況下，歷經較長時段間斷性地投與寡聚物。投藥之後或在投藥同時，可施以抗生素或其他治療性治療。基於免疫檢定、其他生物化學測試及對治療中個體之生理學檢查的結果，可如所指示調整治療方案(劑量、頻率、途徑等)。

使用本發明之反義寡核苷酸的有效活體內治療方案可根據投藥之持續時間、劑量、頻率及途徑以及治療中個體之病況而變化(亦即，預防性投藥相對於對局部或全身感染作反應而進行之投藥)。因此，該活體內療法常常將需要藉由適於治療中之病毒感染之特定類型的測試來監測，以及對劑量或治療方案作出相應調整，以達成最佳治療結果。治療可例如藉由疾病及/或感染之通用指標(諸如全血計數(CBC))、核酸偵測方法、免疫診斷測試、病毒培養或異雙螺旋偵測來監測。

活體內投與之本發明抗病毒反義寡聚物抑制或消除一或多種類型之RNA病毒生長的功效可由在投與反義寡聚物之前、期間及之後自個體獲取之生物樣品(組織、血液、尿液等)來確定。該等樣品之檢定包括(1)使用熟習此項技術者已知之程序(例如電泳凝膠遷移率檢定)監測與標靶及非標靶序列形成之異雙螺旋的存在或不存在；(2)監測病毒蛋白質產生之量，如諸如ELISA或西方墨點法之標準技術所測定；或(3)例如藉由史丕曼-卡伯(Spearman-Karber)方法量測對病毒效價之影響。(參見例如 Pari, G.S. 等人, Antimicrob. Agents and

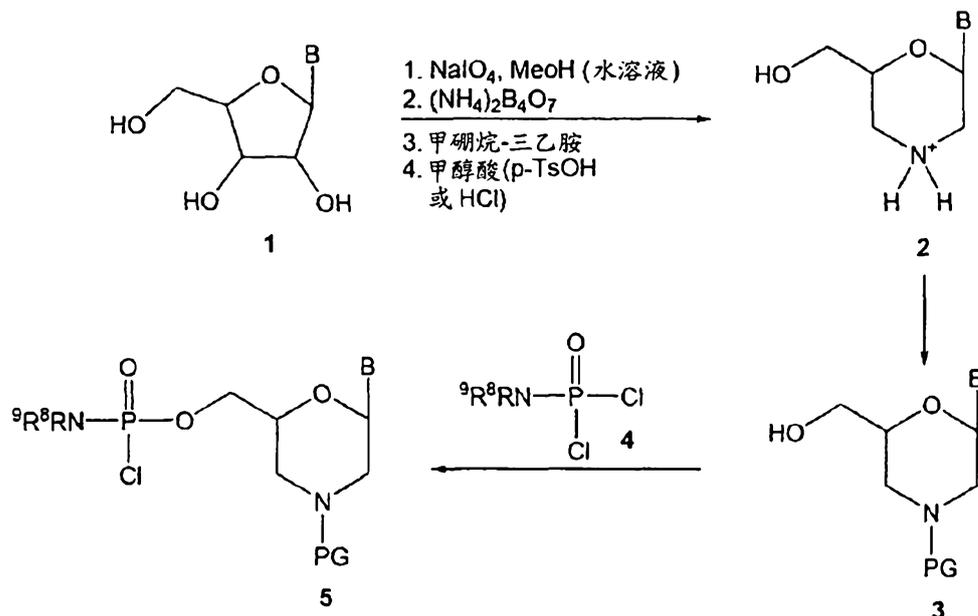
Chemotherapy 39(5):1157-1161, 1995 ; Anderson, K.P. 等人 , Antimicrob. Agents and Chemotherapy 40(9):2004-2011, 1996, Cottral, G.E. (編) , Manual of Standard Methods for Veterinary Microbiology, 第60-93頁 , 1978。)

在一些實施例中，寡聚物係由哺乳動物細胞主動吸收。在其他實施例中，寡聚物可與如本文所述之輸送部分(例如輸送肽)結合以促進該吸收。

E. 寡聚物之製備

嗎啉基單元、經修飾之單元間連結及包含其之寡聚物可如實例中及美國專利第5,185,444號及第7,943,762號中所述來製備，該等專利藉此以全文引用的方式併入。嗎啉基單元可根據以下通用反應流程I來製備。

反應流程1. 製備嗎啉基單元



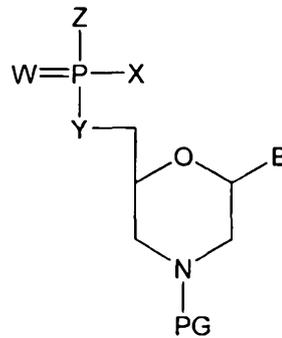
參考反應流程1，其中B表示鹼基配對部分且PG表示保護基，可如所示自相應核苷(1)製備嗎啉基單元。嗎啉基單元(2)可視情況藉由與適合之保護基前驅體(例如三苯甲基氯)反應而受保護。一般在固態寡聚物合成期間移除3'保護基，如下文更詳細描述。鹼基配對部分可

經適當保護以供固相寡聚物合成。適合之保護基包括苄醯基(對於腺嘌呤及胞嘧啶)、苯基乙醯基(對於鳥嘌呤)及特戊醯氧基甲基(對於次黃嘌呤(I))。可將特戊醯氧基甲基引入次黃嘌呤雜環鹼基之N1位置上。儘管可採用未經保護之次黃嘌呤單元，但當鹼基經保護時，活化反應之產率高得多。其他適合保護基包括同在申請中之美國申請案第12/271,040號中所揭示之保護基，該案藉此以全文引用的方式併入。

3與活化磷化合物4反應產生具有所要連結部分(5)之嗎啉基單元。結構4之化合物可使用熟習此項技術者已知之許多方法來製備。舉例而言，該等化合物可藉由使相應胺與氧氯化磷反應來製備。就此而言，胺起始物質可使用此項技術中已知之任何方法來製備，例如實例中及美國專利第7,943,762號中所述之方法。儘管上述流程描述(B)型連結(例如X為 $-NR^8R^9$)之製備，但(A)型連結(例如X為二甲基胺)可依類似方式製備。

結構5之化合物可用於固相自動化寡聚物合成中以製備包含單元間連結之寡聚物。該等方法在此項技術中為熟知的。簡言之，結構5之化合物可在5'端經修飾以含有與固體支撐物之連結子。舉例而言，化合物5可由包含 L^1 及/或 R^{19} 之連結子與固體支撐物連結。例示性方法展示於圖3及圖4中。以此方式，在完成寡聚物合成且自固體支撐物裂解得到寡聚物之後，寡聚物可包含5'-末端修飾。一旦得到支撐，即移除5之保護基(例如三苯甲基)且使游離胺與結構5之第二化合物之活化磷部分反應。重複此順序直至獲得所要長度之寡聚物為止。可移除末端5'端之保護基，或若需要5'-修飾則可保留。可使用許多方法自固體支撐物移除寡聚物，例如以鹼處理以使得與固體支撐物之連結發生裂解。

在一個實施例中，本發明提供用於製備寡聚物之嗎啉基單元，以及相關方法。嗎啉基單元具有以下結構(XXXI)：



(XXXI)

其中W、X及Y如上文關於連結(B)所定義，B為鹼基配對部分，Z為適合離去基，例如鹵基(例如氯)，且PG為保護基，例如C₇-C₃₀芳烷基。在一些實施例中，PG為三苯甲基，例如甲氧基三苯甲基。

經修飾之嗎啉基單元及嗎啉基寡聚物的製備更詳細地描述於實例中。含有任何數目之經修飾連結的嗎啉基寡聚物可使用本文所述之方法、此項技術中已知及/或本文中之參考文獻所述之方法來製備。實例中亦描述如先前所述(參見例如PCT公開案WO2008036127)而製備之PMO+嗎啉基寡聚物的整體修飾。

F. 寡聚物之反義活性

本發明亦提供一種抑制蛋白質產生之方法，該方法包含使編碼該蛋白質之核酸暴露於如本文所揭示之寡聚物。因此，在一個實施例中，使編碼此種蛋白質之核酸暴露於如本文所揭示之包含至少一個(B)型連結，或在其他實施例中包含10%至50%之該等經修飾連結的反義寡聚物，其中鹼基配對部分Pi形成在有效抑制蛋白質產生之位置處與一部分核酸有效雜交之序列。寡聚物可靶向例如mRNA之ATG起始密碼子區域、前mRNA之剪接位點、或病毒標靶序列，如下文所述。在另一實施例中，該方法包含使編碼此種蛋白質之核酸暴露於包含至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰部分)之反義寡聚物。

在另一實施例中，本發明提供一種增強具有由單元間連結接合且載有鹼基配對部分之嗎啉基單元之序列的寡聚物之反義活性的方

法，該方法包含如本文所述修飾寡聚物以含有至少一個經修飾之末端基團、至少一個(B)型單元間連結或其組合。

在一些實施例中，反義活性之增強可由以下證實：

(i) 當反義寡聚物與其標靶序列之結合有效阻斷經編碼蛋白質之轉譯起始密碼子時，經編碼蛋白質之表現相對於相應未經修飾之寡聚物所提供之表現有所減少；或

(ii) 當反義寡聚物與其標靶序列之結合有效阻斷在正確剪接時編碼該蛋白質之前mRNA中之異常剪接位點時，經編碼蛋白質之表現相對於相應未經修飾之寡聚物所提供之表現有所增加。適合於量測此等作用之檢定進一步描述於下文中。在一個實施例中，修飾在無細胞轉譯檢定、細胞培養物中之剪接校正轉譯檢定或功能動物模型系統之剪接校正增益方面提供該活性，如本文所述。在一個實施例中，活性增強至少2倍、至少5倍或至少10倍。

下文描述本發明寡聚物之各種例示性應用，包括抗病毒應用，治療神經肌肉疾病、細菌感染、炎症及多囊性腎病。此描述不欲以任何方式限制本發明，而是用以例示可使用本文所述之包含經修飾之單元間連結之寡聚物處理之人類及動物疾病病況的範圍。

G. 無細胞檢定中之活體外活性

具有經部分修飾之連結(諸如PMO^{apn}(b10)及PMO^{suc}(b45))的寡聚物與相應中性化合物相比對DNA及RNA具有較高親和力，此係藉由活體外及活體內反義活性增強而證實。本發明之寡聚物顯示在針對多種不同標靶時與完全未經修飾之寡聚物相比提供較佳反義活性。在第一系列實驗中，如材料與方法及實例27中所述，製備靶向MDX小鼠肌縮蛋白基因之外顯子23的各種未經修飾、經修飾及與肽結合之PPMO。序列如實例27中所示，其中對於SEQ ID NO: 2-5，先前所述之各位置處(1-嘧啶基)亞磷氧基連結(如圖1B中所示)以「+」指示；對

於SEQ ID NO: 5，4-胺基嘧啶基連結(結構(b10)；圖2)以「^a」指示；或4-丁二醯胺基嘧啶基連結(結構(b45)；圖2)以「^s」指示。如實例27中所述，本發明之含有例示性連結(例如PMO^{apn})之PMO寡聚物與先前所述之PMO+化合物相比更具活性。

1. 靶向ssRNA病毒之莖環二級結構

一類例示性反義抗病毒化合物為如本文所述之嗎啉基寡聚物，例如包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合之寡聚物，其具有12-40個單元之序列及與所靶向病毒之正義RNA股之5'-末端40個鹼基內之莖環二級結構相關之區域互補的靶向序列。(參見例如PCT公開案第WO/2006/033933號或美國申請公開案第20060269911號及第20050096291號，該等案以引用的方式併入本文中。)

該方法包含首先將感染性病毒之正股之5'-末端40個鹼基內之區域鑑別為病毒標靶序列，該區域之序列能夠形成內部莖環二級結構。隨後藉由逐步固相合成來構建如下寡聚物：其包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合，且在其他實施例中，含有20%至50%該等經修飾之連結，且具有與能夠形成內部雙螺旋結構之病毒-基因組區域互補之至少12個單元之靶向序列，其中該寡聚物能夠與病毒標靶序列形成異雙螺旋結構，該結構由病毒正義股及寡核苷酸化合物構成且特徵在於解離T_m為至少45°C且該莖環結構被破壞。

可藉由能夠基於對輸入RNA序列之最小自由能態之搜尋進行二級結構預測的電腦程式分析5'-末端序列(例如5'-末端40個鹼基)來鑑別標靶序列。

在一個相關態樣中，寡聚物可用於抑制哺乳動物宿主細胞中感染性RNA病毒複製之方法中，該病毒具有單股正義基因組且選自以下

家族之一：黃病毒(Flaviviridae)、小核糖核酸病毒(Picornoviridae)、杯狀病毒(Caliciviridae)、披衣病毒(Togaviridae)、動脈炎病毒(Arteriviridae)、冠狀病毒(Coronaviridae)、星狀病毒(Astroviridae)或肝炎病毒(Hepeviridae)家族。該方法包括向受感染之宿主細胞投與病毒抑制量之如本文所述之寡聚物，其具有與正股病毒基因組之5'-末端40個鹼基內能夠形成內部莖環二級結構之區域互補的至少12個單元之靶向序列。該化合物在投與宿主細胞時有效形成如下異雙螺旋結構：(i)由病毒正義股及寡核苷酸化合物構成，及(ii)特徵在於解離 T_m 為至少45°C且該莖環二級結構被破壞。該化合物可投與受病毒感染或處於受病毒感染風險下之哺乳動物個體。

靶向登革病毒(dengue virus)及日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus)之末端莖環結構的例示性靶向序列於下文中分別以SEQ ID NO: 1及2列出。

靶向ssRNA病毒之末端莖環結構的其他例示性靶向序列亦可見於美國申請案第11/801,885號及PCT公開案WO/2008/036127中，該等案以引用的方式併入本文中。

2. 靶向ssRNA病毒之第一開放閱讀框架

第二類例示性反義抗病毒化合物用於抑制小核糖核酸病毒、杯狀病毒、披衣病毒、冠狀病毒及黃病毒家族之病毒生長，該等病毒具有小於12 kb之單股正義基因組及編碼含有多個功能性蛋白質之聚合蛋白質的第一開放閱讀框架。在特定實施例中，病毒為來自冠狀病毒家族之RNA病毒或來自黃病毒家族之西尼羅河病毒(West Nile virus)、黃熱病毒(Yellow Fever virus)或登革病毒。抑制性化合物包含本文所述之反義寡聚物，例如包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個 R^{20})或其組合之寡聚物，其具有與橫跨病毒基因組之第一開放閱讀框架之AUG起始位點的病毒標靶序列實質上互補之靶向

鹼基序列。在該方法之一個實施例中，將寡聚物投與受病毒感染之哺乳動物個體。參見例如PCT公開案第WO/2005/007805號及美國申請公開案第2003224353號，該等案以引用的方式併入本文中。

較佳標靶序列為橫跨病毒基因組之第一開放閱讀框架(ORF1)之AUG起始位點的區域。第一ORF一般編碼含有諸如聚合酶、解螺旋酶及蛋白酶之非結構性蛋白質的聚合蛋白質。「橫跨AUG起始位點」意謂標靶序列在AUG起始位點之一側上包括至少三個鹼基且在另一側上包括至少兩個鹼基(總計至少8個鹼基)。較佳地，標靶序列在起始位點之每一側上包括至少四個鹼基(總計至少11個鹼基)。

更一般而言，較佳標靶位點包括在多種病毒分離株之間保守之標靶。其他適宜位點包括IRES(內部核糖體進入位點)、轉活化蛋白質結合位點及複製起始位點。可藉由靶向對病毒進入及對病毒存在之宿主反應編碼的宿主細胞基因來有效靶向可提供多個冗餘基因之複雜且較大的病毒基因組。

多種病毒-基因組序列可獲自熟知來源，諸如NCBI Genbank資料庫。ORF1之AUG起始位點亦可於基因資料庫或所依據之參考文獻中鑑別，或其可藉由掃描預期ORF1起始位點之區域中AUG密碼子之序列來發現。

四種病毒家族中之每一者之一般基因組織提供於下文中，繼之以針對各家族中之所選成員(類、種或株)而獲得之例示性標靶序列。

3. 靶向流感病毒

第三類例示性反義抗病毒化合物用於抑制正黏液病毒(Orthomyxoviridae)家族之病毒生長及治療病毒感染。在一個實施例中，使宿主細胞與如本文所述之寡聚物接觸，例如包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合，或在其他實施例中，包含20%至50%該等經修飾之連結，且包含與標靶區域

有效雜交之鹼基序列的寡聚物，該標靶區域係選自以下：1)負義病毒RNA區段之5'或3'末端25個鹼基；2)正義cRNA之5'或3'末端之末端25個鹼基；3)流感病毒mRNA之AUG起始密碼子周圍之45個鹼基；及4)經受替代性剪接之流感mRNA之剪接供體或接受體位點周圍之50個鹼基。(參見例如PCT公開案第WO/2006/047683號、美國申請公開案第20070004661號及PCT申請案第2010/056613號及美國申請案第12/945,081號，該等案以引用的方式併入本文中。)

使用下表4中所列及實例29中所述的基於SEQ ID NO:3之寡聚物進行支持本發明且旨在使用具有本發明之經修飾連結之PMO來靶向A型流感病毒(H1N1病毒株PR8)之M1/M2區段的實驗。

表4. 併有經修飾之單元間連結或末端基團之流感靶向序列

NG-10-0038	PMOhex	CGG T ^h TA GAA GAC ^h TCA TC ^h T TT
NG-10-0039	PMOhex	CGG T ^h TA GAA GAC ^h TCA ^h TCT ^h TT
NG-10-0096	PMOapn	CGG T ^a TA GAA GAC ^a TCA TC ^a T TT
NG-10-0097	PMOapn	CGG ^a T ^a TA GAA GAC ^a TCA ^a TC ^a T TT
NG-10-0099	PMOpyr	CGG ^p T ^p TA GAA GAC ^p TCA ^p TC ^p T TT
NG-10-0107	PMOthiol	CGG T ^{SH} TA GAA GAC ^{SH} TCA TC ^{SH} T TT
NG-10-0108	PMOsucc	CGG T ^s TA GAA GAC ^s TCA TC ^s T TT
NG-10-0111	PMOguan	CGG T ^g TA GAA GAC ^g TCA TC ^g T TT
NG-10-0141	PMOpyr	CGG T ^p TA GAA GAC ^p TCA TC ^p T TT
NG-10-0142	PMOpyr	CGG T ^p TA GAA GAC ^p TCA ^p TC ^p T TT
NG-10-0158	PMOglutaric	CGG T ^{glu} TA GAA GAC ^{glu} TCA TC ^{glu} T TT
NG-10-0159	PMOcylo-glut	CGG T ^{cpglu} TA GAA GAC ^{cpglu} TCA TC ^{cpglu} T TT
NG-10-0160	PMOcholic acid	CGG T ^{ca} TA GAA GAC ^{ca} TCA TC ^{ca} T TT
NG-10-0161	PMOdeoxyCA	CGG T ^{dca} TA GAA GAC ^{dca} TCA TC ^{dca} T TT
NG-10-0180	PMOapn	TT ^a T CGA CA ^a T CGG T ^a TA GAA GAC ^a TCA T
NG-10-0174	PMOm	CGG T ^m TA GAA GAC ^m TCA TC ^m T TT
NG-10-0222	PMO MeT	CGG T ^{Me} TA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-10-0223	PMO FarnT	CGG T ^{Farn} TA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-10-0538	PMOapn-三苯甲基	CGG T ^a TA GAA GAC ^a TCA TC ^a T TT

NG-10-0539	PMOapn-三苯甲基	CGG T ^p TA GAA GAC ^p TCA TC ^p T TT
NG-10-0015	PMO	CGG TTA GAA GAC TCA TCT TT
NG-11-0170	PMOplus	CGG +TTA GAA GAC +TCA TC+T TT
NG-11-0145	PMOplus-二苯甲基	CGG T+TA GAA GAC +TCA TC+T TT**
NG-11-0148	PMOisopropylPip	CGG TiprpiTA GAA GAC iprpiTCA TCiprpiT TT
NG-11-0173	PMOpyr	CGG pTTA GAA GAC pTCA TCpT TT
NG-11-0291	三甲基AcGly	CGG T*+TA GAA GAC *+TCA TC*+T TT

**3'-二苯甲基；*+連結為在PMOplus連結處醯化之三甲基甘胺酸；PMOm表示在3-氮位置上具有甲基之T鹼基。

該等化合物尤其適用於治療哺乳動物之流感病毒感染。可將寡聚物可投與受流感病毒感染或處於受流感病毒感染風險下之哺乳動物個體。

4. 靶向小核糖核酸病毒家族之病毒

第四類例示性反義抗病毒化合物用於抑制小核糖核酸病毒家族之病毒生長及治療病毒感染。該等化合物尤其適用於治療哺乳動物之腸病毒及/或鼻病毒感染。在此實施例中，反義抗病毒化合物包含嗎啉基寡聚物，例如包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合且具有12-40個單元之序列的嗎啉基寡聚物，該12-40個單元包括具有與病毒5'未轉譯區域之兩個32保守核苷酸區域之一中之病毒RNA序列相關之區域互補的靶向序列之至少12個單元。(參見例如PCT公開案第WO/2007/030576號及第WO/2007/030691號或同在申請中且共同擁有之美國申請案第11/518,058號及第11/517,757號，該等案以引用的方式併入本文中。)例示性靶向序列於下文以SEQ NO: 6列出。

5. 靶向黃病毒家族之病毒

第五類例示性反義抗病毒化合物用於抑制動物細胞中黃病毒之

複製。此類例示性反義寡聚物為包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合，長度介於8-40個核苷酸鹼基之間且具有與包括正股黃病毒RNA之5'-環化序列(5'-CS)或3'-CS序列之至少一部分的病毒正股RNA基因組之區域互補的至少8個鹼基之序列的嗎啉基寡聚物。極其較佳之標靶為3'-CS且登革病毒之例示性靶向序列於下文以SEQ ID NO: 7列出。(參見例如PCT公開案第WO/2005/030800號或同在申請中且共同擁有之美國申請案第10/913,996號，該等案以引用的方式併入本文中。)

6. 靶向巢病毒家族之病毒

第六類例示性反義抗病毒化合物用於抑制受病毒感染之動物細胞中巢病毒之複製。此類例示性反義寡聚物為如本發明所述包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合且含有8-25個核苷酸鹼基之嗎啉基寡聚物，且其具有能夠破壞正股病毒基因組5'前導區域與負股3'次基因組區域中之轉錄調控序列(TRS)之間的鹼基配對之序列。(參見例如PCT公開案第WO/2005/065268號或美國申請公開案第20070037763號，該等案以引用的方式併入本文中。)

7. 靶向線狀病毒

在另一實施例中，一或多種如本文所述之寡聚物可用於抑制宿主細胞內埃博拉病毒(Ebola virus)或馬堡病毒(Marburg virus)複製之方法中，該方法係藉由使細胞與如本文所述之寡聚物接觸，例如包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合，或在其他實施例中，包含20%至50%該等經修飾之連結，且具有與由正股mRNA之AUG起始位點區域內之至少12個相連鹼基構成之標靶序列互補之靶向鹼基序列的寡聚物，如下文進一步描述。

線狀病毒基因組大約為未分段且處於反義定向之單股RNA之19,000個鹼基。該基因組編碼7種來自與vRNA互補之單順反子mRNA

的蛋白質。

標靶序列為橫跨所選埃博拉病毒蛋白質之AUG起始密碼子或負股病毒RNA之3'末端30個鹼基或恰好處於其下游(25個鹼基內)或上游(100個鹼基內)的正股(正義)RNA序列。儘管亦涵蓋L、核蛋白NP及VP30，但較佳蛋白質標靶為病毒聚合酶單元VP35及VP24。在此等蛋白質中，早期蛋白質較佳，例如，VP35優於晚期表現之L聚合酶。

在另一實施例中，一或多種如本文所述之寡聚物可用於抑制宿主細胞內埃博拉病毒或馬堡病毒複製之方法中，該方法係藉由使細胞與如本文所述之寡聚物接觸，該寡聚物包含至少一個經修飾之單元間連結，或在其他實施例中，包含20%至50%該等經修飾之連結，且具有與由線狀病毒mRNA序列之正股mRNA之AUG起始位點區域內之至少12個相連鹼基構成之標靶序列互補的靶向鹼基序列。(參見例如PCT公開案第WO/2006/050414號或美國專利第7,524,829號及第7,507,196號，及美國申請案第12/402,455號、第12/402,461號、第12/402,464號及第12/853,180號之連續申請案，該等案以引用的方式併入本文中。)

8. 靶向沙粒病毒

在另一實施例中，如本文所述之寡聚物可用於抑制受沙粒病毒家族中之物種感染之哺乳動物細胞之病毒感染的方法中。在一個態樣中，寡聚物可用於治療受病毒感染之哺乳動物個體。(參見例如PCT公開案第WO/2007/103529號或美國專利第7,582,615號，該等案以引用的方式併入本文中。)

表5為如舊世界或新世界沙粒病毒分類所組織，由本發明寡聚物靶向之所靶向病毒的例示性名單。

表5. 所靶向之沙粒病毒

家族	屬	病毒
沙粒病毒	沙粒病毒	舊世界沙粒病毒
		拉沙病毒(Lassa virus, LASV)
		淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒 (Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)
		莫佩亞病毒(Mopeia virus, MOPV)
		新世界沙粒病毒
		瓜納瑞托病毒(Guanarito virus, GTOV)
		胡寧病毒(Junín virus, JUNV)
		馬秋堡病毒(Machupo virus, MACV)
		皮欽德病毒(Pichinide virus, PICV)
		普瑞托病毒(Pirital virus, PIRV)
		薩比亞病毒(Sabiá virus, SABV)
		塔卡里伯病毒(Tacaribe virus, TCRV)
		白水阿羅約病毒(Whitewater Arroyo virus, WWAV)

沙粒病毒之基因組由命名為S(小)及L(大)之兩個單股RNA區段組成。在病毒粒子中，S區段RNA與L區段RNA之莫耳比約為2:1。已確定若干沙粒病毒之完整S區段RNA序列，且其在3,366至3,535個核苷酸之範圍內。亦已確定若干沙粒病毒之完整L區段RNA序列，且其在7,102至7,279個核苷酸之範圍內。S RNA區段與L RNA區段之3'末端序列在最後19個核苷酸之17處相同。此等末端序列在所有已知沙粒病毒之間為保守的。各基因組RNA起始處之5'-末端19或20個核苷酸與各相應3'端不完全互補。歸因於此互補性，認為3'及5'末端為鹼基對且形成鍋柄結構(panhandle structure)。

感染性病毒粒子或病毒RNA(vRNA)複製形成抗基因組病毒互補RNA(vcRNA)股在受感染細胞中發生。vRNA與vcRNA均編碼互補mRNA；因此，沙粒病毒歸類為雙義RNA病毒，而非負義或正義RNA

病毒。病毒基因之雙義定向在L區段與S區段兩者上。NP及聚合酶基因分別位於S及L vRNA區段之3'端處，且以習知負義方式編碼(亦即，其係藉由vRNA或基因組互補mRNA轉錄來表現)。分別位於S及L vRNA區段之5'端的基因GPC及Z以mRNA有義方式編碼，但無證據表明其直接自基因組vRNA轉譯。此等基因實際上藉由來自反基因組之基因組有義mRNA(亦即vcRNA)、發揮複製性中間物之功能的基因組vRNA之全長互補性複本的轉錄來表現。

病毒之沙粒病毒家族之例示性靶向序列於下文中以SEQ ID NO: 8列出。

9. 靶向呼吸道融合病毒(Respiratory Syncytial Virus)

呼吸道融合病毒(RSV)為幼兒中唯一最重要之呼吸道病原體。小於一歲之兒童中RSV引起之下呼吸道病況(諸如細支氣管炎及肺炎)常常需要住院治療。患有心肺疾病之兒童及早產兒尤其易於經歷由此感染所致之嚴重病症。RSV感染亦為老年人及高風險成人中之重要疾病，且在老年人中其為第二大最常鑑別之病毒性肺炎病因(Falsey, Hennessey等人，2005)。世界衛生組織(World Health Organization)估計RSV在世界範圍內每年導致六千四百萬例臨床感染及16萬人死亡。目前尚無疫苗可用於預防RSV感染。儘管在過去數十年吾人對RSV生物學、流行病學、病理生理學及宿主-免疫反應之理解已取得許多主要進展，但關於對患有RSV感染之嬰兒及兒童的最佳管理仍存在相當大的爭議。病毒唑(ribavirin)為用於治療RSV感染之唯一許可抗病毒藥物，但其使用侷限於高風險或病重嬰兒。病毒唑之使用因其成本、可變功效及產生抗性病毒之傾向而受限(Marquardt 1995；Prince 2001)。目前對於其他有效抗RSV藥劑之需要為廣泛公認的。

已知與肽結合之PMO(PPMO)可有效抑制組織培養物中與活體內動物模型系統中之RSV(Lai, Stein等人，2008)。測試旨在靶向包括

RSV L mRNA之5'-末端區域及轉譯起始位點區域之序列的兩種反義PPMO在兩種人類氣管細胞株之培養物中的抗RSV活性。其中之一(RSV-AUG-2; SEQ ID NO 10)使病毒效價減少 $>2.0 \log_{10}$ 。在RSV接種前以RSV-AUG-2 PPMO鼻內(i.n.)治療BALB/c小鼠使感染後(p.i.)第5天肺組織中之病毒效價減少 $1.2 \log_{10}$ ，且使感染後第7天肺部炎症減退。此等資料顯示，RSV-AUG-2提供有效抗RSV活性，值得作為潛在治療應用之候選物進行進一步研究(Lai, Stein等人，2008)。儘管使用如上文所述之RSV-AUG-2 PPMO取得成功，但因考慮到毒性問題及商品成本，仍需要避免在反義抗RSV治療中併入肽結合物。因此，在本發明之另一實施例中，一或多種如本文所述之寡聚物可用於抑制宿主細胞內RSV複製之方法中，該方法係藉由使細胞與如本文所述之寡聚物接觸，該寡聚物為例如包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合，或在其他實施例中，包含10%至50%該等經修飾之連結，且具有與由來自RSV之mRNA之AUG起始位點區域內至少12個相連鹼基構成的標靶序列互補之靶向鹼基序列的寡聚物，如下文進一步描述。

RSV之L基因編碼病毒RNA依賴性RNA聚合酶複合物之關鍵組分。旨在針對橫跨RSV L基因mRNA之AUG轉譯起始位點密碼子之序列且呈RSV-AUG-2 PPMO形式的反義PPMO與自L mRNA之5'末端存在之「基因-起始」序列(GS)至編碼序列中之13 nt的序列互補。因此，較佳L基因靶向序列與自L基因mRNA之5'末端在3'方向上延伸40個鹼基或延伸22個鹼基至如下表3中SEQ ID NO: 9所示之L基因編碼序列中的任何12個相連鹼基互補。例示性RSV L基因靶向序列於下表3中以SEQ ID NO: 10-14列出。本文所述之本發明之任何單元間修飾皆可併入寡聚物中以提供增加之反義活性、改良之細胞內傳遞及/或針對改良之治療活性的組織特異性。含有本發明之單元間連結的例示性寡聚

物列於下表6中。

表6. RSV標靶及靶向序列

名稱	序列(5'至3')	SEQ ID NO
L標靶	GGGACAAAATGGATCCCATTATTAATGGAAATTCTGCTAA	9
RSV-AUG-2	TAATGGGATCCATTTTGTCCC	10
RSV-AUG3	AATAATGGGATCCATTTTGTCCC	11
RSV-AUG4	CATTAATAATGGGATCCATTTTGTCCC	12
RSV-AUG5	GAATTTCCATTAATAATGGGATCCATTTTG	13
RSV-AUG6	CAGAATTTCCATTAATAATGGGATCCATT	14
RSV-AUG3apn*	AATAA ^{apn} TGGGA ^{apn} TCCA ^{apn} TT ^{apn} TTG ^{apn} TCCC	11
RSV-AUG3guan	AATAA ^{guan} TGGGA ^{guan} TCCA ^{guan} TT ^{guan} TTG ^{guan} TCCC	11

10. 神經肌肉疾病

在另一實施例中，提供治療性寡聚物用於治療與哺乳動物個體之神經肌肉疾病相關的疾病病況。顯示增強輸送至肌肉組織中之例示性單元間寡聚物修飾包括具有結構b6、b10、b51及b54之單元間連結的修飾。測試將該等連結併入M23D反義寡聚物(SEQ ID NO: 16)中之反義寡聚物在MDX小鼠模型中對於杜興氏肌肉營養不良(Duchene Muscular Dystrophy, DMD)之活性，如實例中所述。併有一些實施例中所用之連結的例示性寡聚物列於下表7中。在一些實施例中，治療性化合物可選自由以下組成之群：

(a) 靶向人類肌肉抑制素之反義寡聚物，其具有與由SEQ ID NO: 18鑑別之人類肌肉抑制素mRNA之標靶區域中至少12個相連鹼基互補的鹼基序列，用於治療肌肉萎縮病況，如先前所述(參見例如美國專利申請案第12/493,140號，其以引用的方式併入本文中；及PCT公開案WO2006/086667)。例示性鼠類靶向序列以SEQ ID NO: 19-20列出。

(b) 能夠在DMD蛋白質(肌縮蛋白)中產生外顯子跳越以恢復肌縮蛋白之部分活性來治療DMD之反義寡聚物，諸如具有選自SEQ ID

NO: 22至35之序列的PMO，如先前所述(參見例如PCT公開案第WO/2010/048586號及第WO/2006/000057號或美國專利公開案第US09/061960號，該等案皆以引用的方式併入本文中)。

可使用本發明之經修飾連結及末端基團來治療若干其他神經肌肉疾病。下文論述用於治療脊髓性肌肉萎縮症(spinal muscle atrophy, SMA)及強直性肌肉營養不良(myotonic dystrophy, DM)之例示性化合物。

SMA為由脊髓中 α -運動神經元之慢性損失引起之常染色體隱性疾病且可影響兒童與成人。存活運動神經元(SMN)之表現減少導致該疾病(Hua, Sahashi等人, 2010)。導致SMA之突變位於SMN1基因中，但旁系同源基因SMN2若自缺乏外顯子7之替代性剪接形式($\delta 7$ SMN2)表現，則其可藉由補償SMN1之損失而得以生存。靶向內含子6、外顯子7及內含子7之反義化合物皆已顯示不同程度地誘導外顯子7包涵。靶向內含子7之反義化合物較佳(參見例如PCT公開案第WO/2010/148249號、第WO/2010/120820號、第WO/2007/002390號及美國專利第7838657號)。靶向SMN2前mRNA且誘導改良之外顯子7包涵的例示性反義序列於下文中以SEQ ID NO: 36-38列出。預期使用本文所述之經修飾連結及末端基團之此等寡聚物序列的所選修飾與此項技術中已知之修飾相比將具有改良之特性。此外，預期靶向SMN2基因之內含子7且併有本發明之特徵的任何寡聚物皆具有誘導外顯子7包涵且對SMA患者提供治療效益之潛力。1型強直性肌肉營養不良(DM1)及2型強直性肌肉營養不良(DM2)為由導致神經肌肉退化之毒性RNA之表現引起的顯性遺傳性病。DM1及DM2分別與轉錄物強直性肌肉營養不良蛋白激酶(DMPK)及鋅指蛋白9(ZNF9)之3'-UTR及內含子1區域中之長polyCUG及polyCCUG重複相關聯(參見例如WO2008/036406)。儘管正常個體具有多達30個CTG重複，但DM1患者具有50至數千範圍內之

較大重複數。疾病之嚴重度及發作之年齡與重複數有關。成年發作之患者展示較輕症狀且具有小於100個重複，青少年發作之DM1患者具有多達500個重複且先天性病例通常具有約一千個CTG重複。含有CUG重複之擴展轉錄物形成二級結構，以核點及螯合RNA-結合蛋白質(RNA-BP)之形式積聚於核中。該疾病中已牽涉若干RNA-BP，包括盲肌樣 (muscleblind-like, MBNL) 蛋白質及 CUG- 結合蛋白質 (CUGBP)。MBNL蛋白質與感光器及肌肉分化所必需之果蠅盲肌(Mbl)蛋白質同源。MBNL及CUGBP已鑑別為DM1中受影響之轉錄物的拮抗性剪接調控子，諸如心肌鈣蛋白T(cardiac troponin T, cTNT)、胰島素受體(IR)及肌肉特異性氯離子通道(CIC-1)。

在此項技術中已知，靶向DMPK基因之擴展重複的反義寡核苷酸在動物DM1模型中可置換RNA-BP螯合且逆轉肌強直症狀(WO2008/036406)。預期併有本發明特徵之寡聚物將為DM1及DM2患者提供改良之活性及治療潛力。靶向上文所述之polyCUG及polyCCUG重複之例示性序列於下文以SEQ ID NO: 39-55列出且進一步描述於美國申請案第13/101,942號中，該案以全文併入本文中。

預期用於治療神經肌肉病症之本發明其他實施例且包括旨在治療其他DNA重複不穩定性遺傳病症之寡聚物。如WO2008/018795中所述，此等疾病包括亨廷頓氏病(Huntington's disease)、脊髓小腦共濟失調、X連鎖脊髓延髓肌肉萎縮及10型脊髓小腦共濟失調(SCA10)。

實例27中描述支持本發明且使用MDX小鼠(鼠類DMD模型)進行之實驗。

表7. 併有經修飾之單元間連結及/或3'及/或5'末端基團之
M23D序列(SEQ ID NO:15)

NG	PMO-X 修飾	5'	序列	3'
NG-10-0383	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯基乙醯基
NG-10-0325	三苯膦基	OH	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA T	三苯膦基
NG-10-0272	PMO-法呢基	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	法呢基
NG-10-0102	PMO	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯甲基
NG-10-0330	三甲氧基苄 醯基	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三甲氧基苄醯基
NG-10-0056	PMOplus 5'- pol	EG3	GGC C ⁺ A ⁺ A ⁺ ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	H
NG-07-0064	PMO-3'- 三苯甲基	H-Pip	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯甲基
NG-10-0382	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯基丙醯基
NG-10-0278	PMOpyr	EG3	GGC CAA ACC pTCG GCpT pTAC CpTG AAA pT	H
NG-10-0210	PMOapn	EG3	GGC C ^a A ^a A ^a ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	H
NG-10-0098	PMOpyr	EG3	GGC CAA ACC ^p TCG GC ^p T TAC C ^p TG AAA T	H
NG-10-0070	PMOapn	EG3	GGC CAA ACC ^a TCG GC ^a T TAC C ^a TG AAA ^a T	H
NG-10-0095	PMOapn	EG3	GGC CAA ACC ^a TCG GC ^a T ^a TAC C ^a TG AAA ^a T	H
NG-10-0317	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	法呢基
NG-10-0477	PMO triMe Gly	EG3	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA F	三甲基甘胺酸
NG-10-0133	PMOapn	OH	GGC C ^a AA ^a ACC ^a TCG GC ^a T ^a TAC C ^a TG AAA ^a T	H
NG-10-0387	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	2-OH, 二苯基乙 醯基
NG-10-0104	PMOguan	EG3	GGC CAA ACC ^g TCG GC ^g T TAC C ^g TG AAA T	Δ ^g
NG-10-0420	PMOplus 甲基	EG3	GGC CAA ACC ^m TCG GC ^m T TAC C ^m TG AAA ^m T	三苯甲基

NG	PMO-X 修飾	5'	序列	3'
NG-10-0065	PMOtri	EG3	GGC CAA ACC 'TCG GC'T TAC C'T G AAA T	H
NG-10-0607	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	9-萘-羧基
NG-10-0060	PMOcp	EG3	GGC CAA ACC ^{cp} TCG GC ^{cp} T TAC C ^{cp} T G AAA T	H
NG-10-0162	PMO- COCH ₂ SH	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	COCH ₂ SH
NG-10-0328	二苯基乙醯基	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	二苯基乙醯基
NG-10-0134	PMOapn PMOtri	OH	GGC C ^a AA ^a ACC 'TCG GC'T 'TAC C'TG AAA 'T	H
NG-10-0386	PMO	DPA	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	5'-二苯基乙醯 基, 3'-三苯甲基
NG-07-0064	PMO-3'- 三苯甲基	H-Pip	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯甲基
NG-10-0059	PMOcp	EG3	GGC CAA ACC ^{cp} TCG GC ^{cp} T ^{cp} TAC C ^{cp} T G AAA ^{cp} T	H
NG-10-0135	PMOtri	OH	GGC CAA ACC 'TCG GC'T 'TAC C'TG AAA 'T	H
NG-10-0168	PMOapn PMOcys	OH	GGC CAA ACC ^a TCG GC ^a T ^a TAC C ^a TG AAA ^{SHc} T	H
NG-10-0113	PMOapn PMOtri	OH	GGC CAA ACC ^a TCG GC'T 'TAC C ^a TG AAA ^a T	H
NG-10-0385	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	二苯基磷醯基
NG-10-0279	PMO	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	香葉草基
NG-10-0055	PMOplus <i>disp</i>	EG3	GGC C ⁺ AA ⁺ ACC 'TCG GC ⁺ T TAC C ⁺ TG AAA T	H
NG-10-0105	PMOsucc	EG3	GGC CAA ACC ^s TCG GC ^s T TAC C ^s T G AAA T	Δ ^s
NG-10-0805	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC ^{Etpip} TCG GC ^{Etpip} T TAC C ^{Etpip} TG AAA ^{Etpip} T	H
NG-10-0811	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC ^{pyrQMe} TCG GC ^{pyrQMe} T TAC C ^{pyrQMe} TG AAA ^{pyrQMe} T	H
NG-10-0057	PMOplus 3'- <i>pol</i>	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC C ⁺ TG ⁺ A ⁺ A ⁺ A T	H
NG-10-0625	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	5-羧基螢光素
NG-10-0804	二聚體	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	二聚化

NG	PMO-X 修飾	5'	序列	3'
NG-10-0066	PMOtri	EG3	GGC CAA ACC 'TCG GC'T TAC C'T G AAA 'T	H
NG-10-0280	PMO二硫化 物	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	COCH ₂ CH ₂ SSPy
NG-10-0212	PMOapn	EG3	GGC CaAaA aACC aTCG GCaT aTaAC CaTG aAaAa aT	H
NG-10-0156	3'-MeO 三苯甲基	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	MeO-Tr
NG-10-0062	PMOhex	EG3	GGC CAA ACC ^h TCG GC ^h T TAC C ^h T G AAA ^h T	H
NG-11-0043	PMO-X	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	胍基
NG-10-0206	PMOplus	EG3	GGC C+A+A +ACC +TCG GC+T +T+AC C+TG +A+A+A +T	H
NG-10-0383	PMO	EG3	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	三苯基乙醯基
NG-10-0325	三苯膦基	OH	GGC CAA ACC FCG GCF TAC CFG AAA T	三苯膦基
NG-10-0272	PMO-法呢基	OH	GGC CAA ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	法呢基

*二聚化指示寡聚物係由連結兩個單體之3'末端的連結二聚化。舉例而言，連結可為-COCH₂CH₂-S-CH(CONH)CH₂-O-NHCH₂CO-或任何其他適合連結。

11. 抗細菌應用

在另一實施例中，本發明包括一種用於治療哺乳動物宿主之細菌感染的抗細菌反義寡聚物。在一些實施例中，寡聚物包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個R²⁰)或其組合，其具有10至20個鹼基及具有與醯基載體蛋白(acpP)、旋轉酶A單元(gyrA)、ftsZ、核糖體蛋白S10(rpsJ)、leuD、mgtC、pirG、pcaA及cma1基因之感染性細菌mRNA之標靶區域互補之至少10個相連鹼基的靶向序列，其中該標靶區域含有細菌mRNA之轉譯起始密碼子，或轉譯起始密碼子之上游(亦即5')或下游(亦即3')方向上20個鹼基內之序列，且其中該寡聚物結合於mRNA以形成異雙螺旋，藉此抑制細菌複製。

亦包括寡聚物之結合物，其中與寡聚物結合者為在肽之羧基末端與寡核苷酸偶合之富含精胺酸載體蛋白，且較佳由肽序列 $(RXX)_n$ -或 $(RXR)_n$ 表示，其中X為選自由丙胺酸、 β -丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、絲胺酸、甘胺酸、蘇胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及6-胺基己酸組成之群的不帶電荷胺基酸，且 $n=2$ 至4。在例示性實施例中，載體肽具有序列 $(RFF)_n$ 、 $(RFF)_nR$ 或 $(RXR)_n$ ，其中 $n=2$ 至4。載體肽可在其C-末端經單胺基酸或雙胺基酸連結子(諸如連結子 $Ahx\beta Ala$ ，其中 Ahx 為6-胺基己酸且 βAla 為 β -丙胺酸)與寡聚物之一端(例如3'端或5'端)連結。如在活體外歷經8小時時段使細菌生長抑制至少10倍且較佳 10^2 或 10^3 倍所量測，載體肽當與寡核苷酸之3'端或5'端結合時具有增強寡核苷酸之抗細菌活性的能力。在一個較佳實施例中，載體肽具有序列 $(RAhxR)_n$ ，其中 $n=4$ 。

12. 調節核激素受體

在另一實施例中，本發明係關於調節來自核激素受體超家族(NHRSF)之核激素受體(NHR)之表現的組合物及方法，此主要藉由控制或改變編碼該等受體之前mRNA之剪接來達成。特定NHR之實例包括糖皮質激素受體(GR)、孕酮受體(PR)及雄激素受體(AR)。在某些實施例中，本文所述之反義寡核苷酸及藥劑使得配位體非依賴性形式或其他所選形式之受體的表現增加，且其非活性形式之表現減少。

本發明之實施例包括寡聚物及寡核苷酸類似物，例如包含至少一個(B)型連結及/或至少一個末端修飾(例如至少一個 R^{20})或其組合之寡聚物，其與NHR之所選外顯子或內含子序列互補，包括NHRSF 前mRNA以及本文所述之其他NHR結構域之「配位體結合外顯子」及/或相鄰內含子。術語「配位體結合外顯子」係指存在於野生型mRNA中，但自初始轉錄物(「前mRNA」)移除以產生配位體非依賴性形式之mRNA的外顯子。在某些實施例中，互補可基於橫跨剪接位點之前

mRNA序列中之序列，其包括(但不限於)基於橫跨外顯子-內含子接合之序列的互補。在其他實施例中，互補可僅基於內含子之序列。在其他實施例中，互補可僅基於外顯子之序列。(參見例如美國申請案第13/046,356號，其以引用的方式併入本文中。)

NHR調節劑可用於治療NHR相關疾病，包括與轉錄受NHRs刺激或抑制之基因之表現產物相關的疾病。舉例而言，抑制AP-1及/或NF- κ B之NHRs調節劑可用於治療本文所述及此項技術中已知之發炎及免疫疾病及病症，諸如骨關節炎、類風濕性關節炎、多發性硬化症、哮喘、發炎性腸病、移植排斥反應及移植物抗宿主疾病。轉活化拮抗化合物可用於治療與糖皮質激素含量增加相關之代謝疾病，諸如糖尿病、骨質疏鬆症及青光眼。又，轉活化促效化合物可用於治療與糖皮質激素缺乏相關之代謝疾病，諸如阿狄森氏病(Addison's disease)及其他疾病。

本發明之實施例包括調節細胞中核NHR活性或表現之方法，其包含使細胞與反義寡聚物接觸，該反義寡聚物係由嗎啉基次單元經由含磷次單元間連結將一個次單元之嗎啉基氮與相鄰次單元之5'環外碳接合連結所構成，其中該寡核苷酸含有10至40個鹼基及與標靶序列互補之至少10個相連鹼基之靶向序列，其中該標靶序列為NHR之前mRNA轉錄物，藉此調節NHR之活性或表現。在某些實施例中，寡聚物改變該前mRNA轉錄物之剪接且增加NHR變異體之表現。在一些實施例中，寡聚物誘導該前mRNA轉錄物之一或多個外顯子的全部或部分外顯子跳越。在某些實施例中，一或多個外顯子編碼NHR之配位體結合域之至少一部分，且變異體為配位體非依賴性形式之NHR。在某些實施例中，一或多個外顯子編碼NHR之轉活化域之至少一部分，且變異體具有減少之轉錄活化活性。在某些實施例中，一或多個外顯子編碼NHR之DNA結合域之至少一部分。在某些實施例中，一或多個外

顯子編碼NHR之N端活化域之至少一部分。在某些實施例中，一或多個外顯子編碼NHR之羧基端域之至少一部分。在特定實施例中，變異體結合於NF-KB、AP-1或兩者，且減少其促發炎標靶基因之一或多者的轉錄。

在某些實施例中，寡聚物對NHR之轉活化轉錄活性起促效作用。在其他實施例中，寡聚物對NHR之轉活化轉錄活性起拮抗作用。在某些實施例中，寡聚物對NHR之轉抑制活性起促效作用。在其他實施例中，寡聚物對NHR之轉抑制活性起拮抗作用。在特定實施例中，寡聚物對NHR之轉活化轉錄活性起拮抗作用且對NHR之轉抑制活性起促效作用。(參見例如美國申請案第61/313,652號，其以引用的方式併入本文中。)

實例

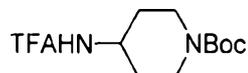
除非另有註釋，否則所有化學品皆獲自Sigma-Aldrich-Fluka。苄醯基腺苷、苄醯基胞苷及苯基乙醯基鳥苷係獲自Carbosynth Limited, UK。

PMO、PMO+、PPMO及含有如本文所述之其他連結修飾的PMO係使用此項技術中已知之方法合成且描述於申請中之美國申請案第12/271,036號及第12/271,040號及PCT公開案第WO/2009/064471號中，該等案藉此以全文引用的方式併入。

具有3'三苯甲基修飾之PMO基本上如PCT公開案第WO/2009/064471號中所述來合成，但省略脫除三苯甲基之步驟。

實例1

4-(2,2,2-三氟乙醯胺基)哌啶-1-甲酸第三丁酯

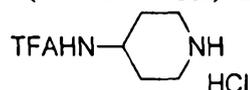


在攪拌下，向4-胺基哌啶-1-甲酸第三丁酯(48.7 g, 0.243 mol)及

DIPEA(130 mL, 0.749 mol)於DCM(250 mL)中之懸浮液中逐滴添加三氟乙酸乙酯(35.6 mL, 0.300 mol)。20小時後，以檸檬酸溶液(200 mL×3, 10% w/v水溶液)及碳酸氫鈉溶液(200 mL×3, 濃水溶液)洗滌溶液，乾燥(MgSO₄)，且經二氧化矽(24 g)過濾。以DCM洗滌二氧化矽，且部分濃縮經合併之溶離液(100 mL)且直接用於下一步驟中。APCI/MS：C₁₂H₁₉F₃N₂O₃之計算值296.1，實驗值*m/z*=294.9 (M-1)。

實例2

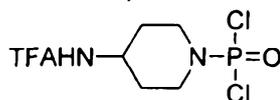
2,2,2-三氟-N-(哌啶-4-基)乙醯胺鹽酸鹽



向實例1之標題化合物之經攪拌DCM溶液(100 mL)中逐滴添加氯化氫(250 mL, 1.0 mol)於1,4-二噁烷(4 M)中之溶液。繼續攪拌6小時，隨後過濾懸浮液，且以乙醚(500 mL)洗滌固體，得到呈白色固體狀之標題化合物(54.2 g, 產率96%)。APCI/MS：C₇H₁₁F₃N₂O之計算值196.1，實驗值*m/z*=196.9 (M+1)。

實例3

(4-(2,2,2-三氟乙醯胺基)哌啶-1-基)磷酸二氯化物

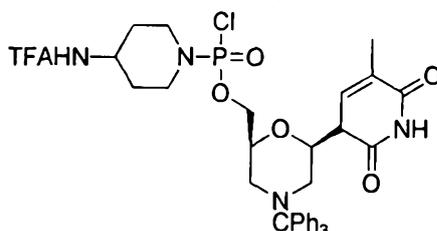


向實例2之標題化合物(54.2 g, 0.233 mol)於DCM(250 mL)中之經冷卻(冰/水浴)懸浮液中逐滴添加氧氯化磷(23.9 mL, 0.256 mol)及DIPEA(121.7 mL, 0.699 mol)且攪拌。15分鐘後，移除浴，且在繼續攪拌下使混合物升溫至周圍溫度。1小時後，部分濃縮混合物(100 mL)，過濾懸浮液，且以乙醚洗滌固體，得到呈白色固體狀之標題化合物(43.8 g, 產率60%)。部分濃縮溶離液(100 mL)，過濾所得懸浮液，且以乙醚洗滌固體，得到另一份標題化合物(6.5 g, 產率9%)。ESI/MS：1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物C₁₇H₂₂ClF₃N₅O₄P之計算值483.1，

實驗值 $m/z=482.1$ (M-1)。

實例4

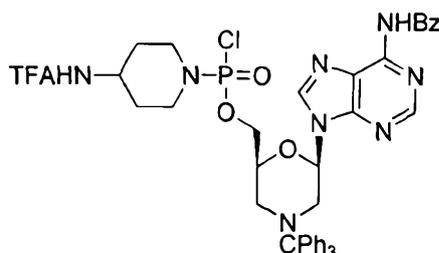
(4-(2,2,2-三氟乙醯胺基)哌啶-1-基)氯代磷酸((2S,6S)-6-((R)-5-甲基-2,6-二側氧基-1,2,3,6-四氫吡啶-3-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯



歷經 10 分鐘，向實例 3 之標題化合物 (29.2 g, 93.3 mmol) 於 DCM (100 mL) 中之經攪拌且經冷卻 (冰/水浴) 溶液中逐滴添加 Mo(Tr)T # (22.6 g, 46.7 mmol)、2,6-二甲基吡啶 (21.7 mL, 187 mmol) 及 4-(二甲基胺基)吡啶 (1.14 g, 9.33 mmol) 之 DCM 溶液 (100 mL)。使該浴升溫至周圍溫度。15 小時後，以檸檬酸溶液 (200 mL × 3, 10% w/v 水溶液) 洗滌溶液，乾燥 (MgSO₄)，濃縮，且將粗油直接加載至管柱上。濃縮層析 [SiO₂ 管柱 (120 g)，己烷/EtOAc 溶離劑 (梯度 1:1 至 0:1)，重複 3 次] 溶離份，得到呈白色固體狀之標題化合物 (27.2 g, 產率 77%)。ESI/MS：1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物 C₄₆H₅₀F₃N₈O₈P 之計算值 930.3，實驗值 $m/z=929.5$ (M-1)。

實例5

(4-(2,2,2-三氟乙醯胺基)哌啶-1-基)氯代磷酸((2S,6R)-6-(6-苄醯胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯

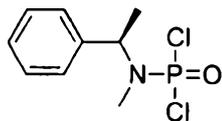


以類似於實例 4 中所述之方式合成標題化合物，得到呈白色固體狀之標題化合物 (15.4 g, 產率 66%)。ESI/MS：1-(4-硝基苯基)哌嗪衍

生物 $C_{53}H_{53}F_3N_{11}O_7P$ 之計算值1043.4，實驗值 $m/z=1042.5$ (M-1)。

實例6

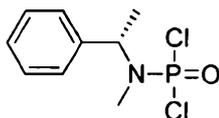
(R)-甲基(1-苯乙基)胺基磷酸二氯化物



向氧氯化磷(2.83 mL, 30.3 mmol)於DCM(30 mL)中之經冷卻(冰/水浴)溶液中依序逐滴且在攪拌下添加2,6-二甲基吡啶(7.06 mL, 60.6 mmol)以及(R)-(+)-*N*,*a*-二甲基苄基胺(3.73 g, 27.6 mmol)之DCM溶液。5分鐘後，移除該浴，且使反應混合物升溫至周圍溫度。1小時後，以檸檬酸溶液(50 mL×3, 10% w/v水溶液)洗滌反應溶液，乾燥(MgSO₄)，經SiO₂過濾且濃縮，得到呈白色泡沫狀之標題化合物(3.80 g)。ESI/MS：1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物C₁₉H₂₅N₄O₄P之計算值404.2，實驗值 $m/z=403.1$ (M-1)。

實例7

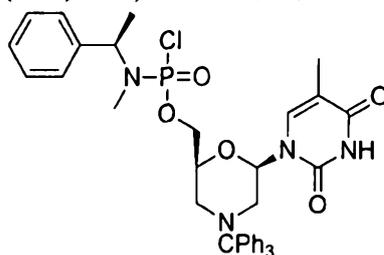
(S)-甲基(1-苯乙基)胺基磷酸二氯化物



以類似於實例6中所述之方式合成標題化合物，得到呈白色泡沫狀之標題化合物(3.95 g)。ESI/MS：1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物C₁₉H₂₅N₄O₄P之計算值404.2，實驗值 $m/z=403.1$ (M-1)。

實例8

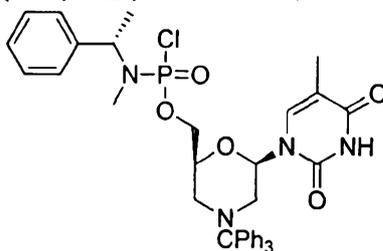
甲基((R)-1-苯乙基)氯代胺基磷酸((2*S*,6*R*)-6-(5-甲基-2,4-二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2*H*)-基)-4-三苯基嗎啉-2-基)甲酯



以類似於實例4中所述之方式合成標題化合物，得到呈白色固體狀之標題氯代磷醯胺酸(4.46 g，產率28%)。ESI/MS： $C_{38}H_{40}ClN_4O_5P$ 之計算值698.2，實驗值 $m/z=697.3$ (M-1)。

實例9

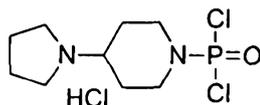
甲基((S)-1-苯乙基)氯代胺基磷酸((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯



以類似於實例4中所述之方式合成標題化合物，得到呈白色固體狀之標題氯代磷醯胺酸(4.65 g，產率23%)。ESI/MS： $C_{38}H_{40}ClN_4O_5P$ 之計算值698.2，實驗值 $m/z=697.3$ (M-1)。

實例10

(4-(吡咯啶-1-基)哌啶-1-基)磷酸二氯化物鹽酸鹽



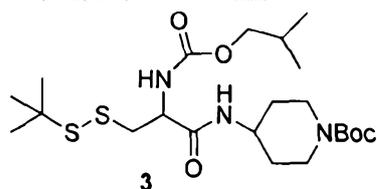
向氧氯化磷(5.70 mL，55.6 mmol)於DCM(30 mL)中之經冷卻(冰/水浴)溶液中添加2,6-二甲基吡啶(19.4 mL，167 mmol)以及4-(1-吡咯啶基)-哌啶(8.58 g，55.6 mmol)之DCM溶液(30 mL)，且攪拌1小時。過濾懸浮液，且以過量乙醚洗滌固體，得到呈白色固體狀之標題吡咯啶(17.7 g，產率91%)。ESI/MS：1-(4-硝基苯基)哌嗪衍生物 $C_{19}H_{30}N_5O_4P$ 之計算值423.2，實驗值 $m/z=422.2$ (M-1)。

實例11

(4-(吡咯啶-1-基)哌啶-1-基)氯代磷酸((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯鹽酸鹽

4-(3-(第三丁基二硫基)-2-(異丁氧基羰基胺基)丙醯胺基)哌啶-1-

甲酸第三丁酯

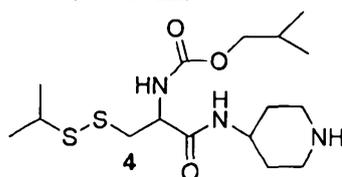


向含酸(來自實例12之化合物2, 6.98 g, 22.6 mmol)之DMF(50 ml)中添加HATU(8.58 g, 22.6 mmol)。30分鐘後, 向混合物中添加休尼格鹼(Hunig base)(4.71 ml, 27.1 mmol)及1-Boc-4-胺基哌啶(5.43 g, 27.1 mmol)。在室溫下再繼續攪拌反應物3小時。在高真空下移除DMF, 將粗殘餘物溶解於EtAc(300 ml)中, 以H₂O(50 ml×3)洗滌。ISCO純化(5% MeOH/DCM)後獲得最終產物(3)。

實例14

3-(異丙基二硫基)-1-側氧基-1-(哌啶-4-基胺基)丙-2-基胺基甲酸

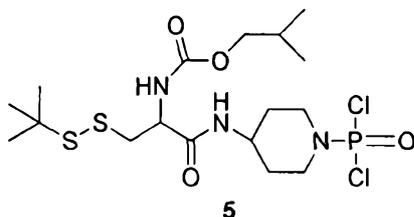
異丁酯



向實例13中製備之化合物3(7.085 g, 18.12 mmol)中添加30 ml 4 M HCl/二噁烷。在室溫下2小時後反應完成。鹽酸鹽(4)未經進一步純化即用於下一步驟。

實例15

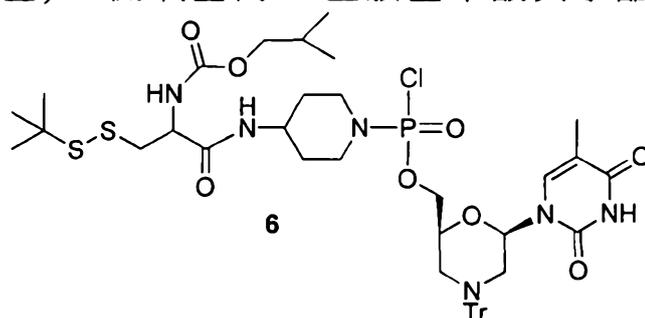
3-(第三丁基二硫基)-1-(1-(二氯磷醯基)哌啶-4-基胺基)-1-側氧基丙-2-基胺基甲酸異丁酯



在-78°C下、於Ar下，向含實例15中製備之化合物4(7.746 g，18.12 mmol)之DCM(200 ml)中緩慢注入POCl₃(1.69 ml，18.12 mmol)，繼而添加Et₃N(7.58 ml，54.36 mmol)。在室溫下攪拌反應物5小時，濃縮以移除過量鹼及溶劑。ISCO純化(50% EtAc/己烷)後得到呈白色固體狀之產物(5)。

實例16

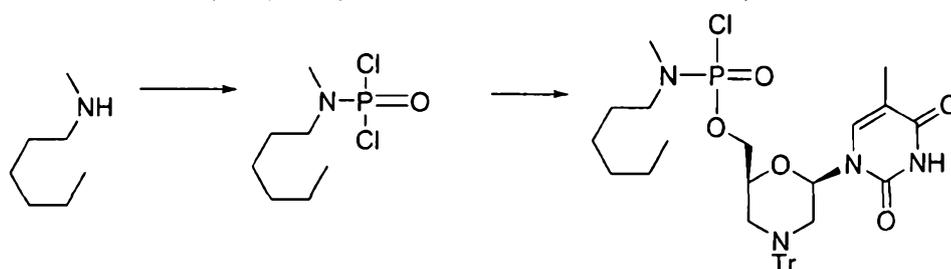
3-(第三丁基二硫基)-1-(1-(氯(((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲氧基)磷酰基)哌啶-4-基胺基)-1-側氧基丙-2-基胺基甲酸異丁酯



在0°C下，向含1-((2R,6S)-6-(羥基甲基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)-5-甲基嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(moT(Tr))(5.576 g，10.98 mmol)之DCM(100 ml)中添加二甲基吡啶(1.92 ml，16.47 mmol)及DMAP(669 mg，5.5 mmol)，繼而添加4(6.13 g，12.08 mmol)。在室溫下攪拌反應物18小時。ISCO純化(50% EtAc/己烷)後獲得所要產物(6)。

實例17

己基(甲基)氯代胺基磷酸((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯



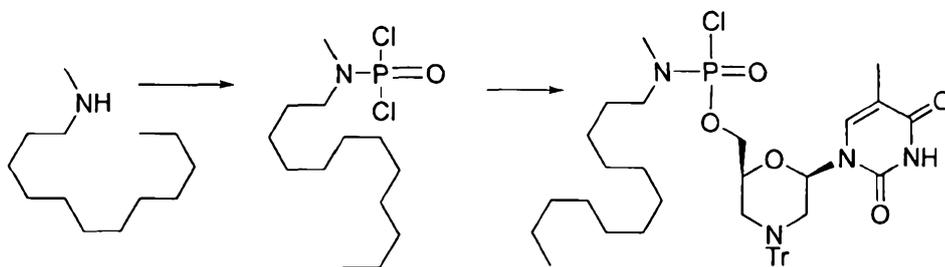
在N₂下，將N-羥基甲胺(4.85 ml，32 mmol)之DCM(80 ml)溶液冷

卻至-78°C。依序緩慢添加磷醯氯(2.98 ml, 32mmol)於DCM(10 ml)中之溶液、Et₃N(4.46 ml, 32 mmol)於DCM(10 ml)中之溶液。繼續攪拌，同時使反應物升溫至室溫隔夜。ISCO純化(20% EtAc/己烷)後得到呈透明油狀之所要產物(1)。

在0°C下，向含moT(Tr)(5.10 g, 10.54 mmol)之DCM(100 ml)添加二甲基吡啶(3.68 ml, 31.6 mmol)及DMAP(642 mg, 5.27 mmol)，繼而添加**1**(4.89 g, 21.08 mmol)。在室溫下攪拌反應物18小時。ISCO純化(50% EtOAc/己烷)後獲得所要產物(2)。

實例18

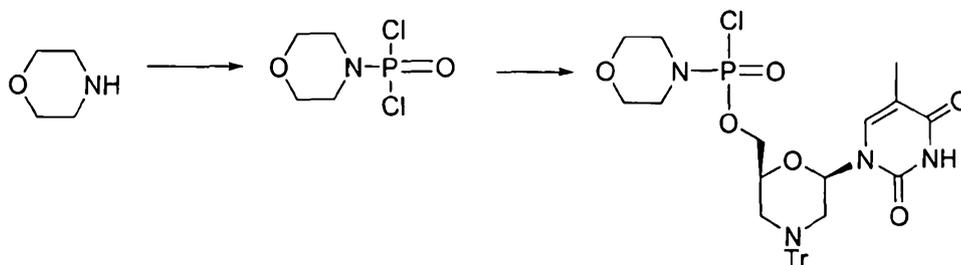
十二烷基(甲基)氯代胺基磷酸((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯



根據實例6及8中所述之通用程序製備標題化合物。

實例19

嗎啉基氯代磷酸((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯

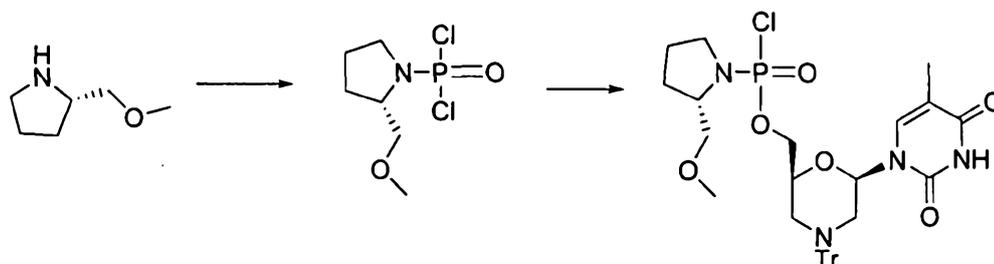


根據實例6及8中所述之通用程序製備標題化合物。

實例20

(S)-2-(甲氧基甲基)吡咯啶-1-基氯代磷酸((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-

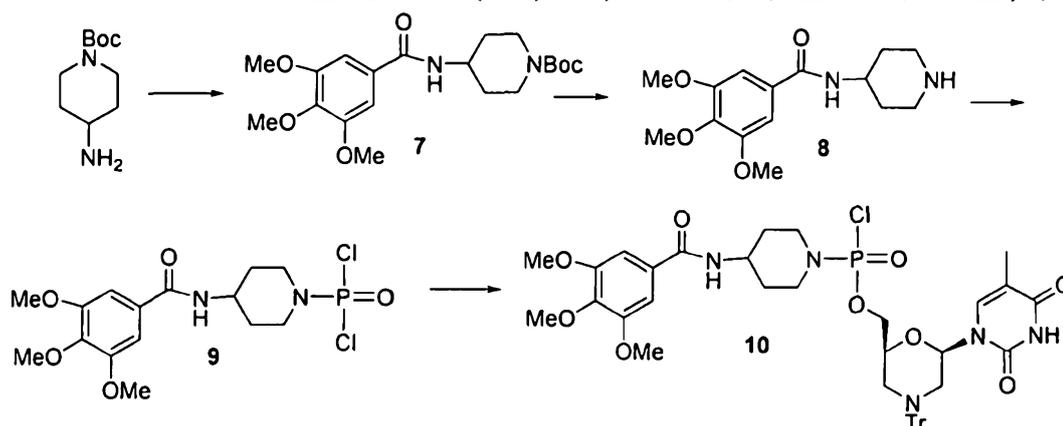
二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯



根據實例6及8中所述之通用程序製備標題化合物。

實例21

4-(3,4,5-三甲氧基苄醯胺基)哌啶-1-基氯代磷酸((2S,6R)-6-(5-甲基-2,4-二側氧基-3,4-二氫嘧啶-1(2H)-基)-4-三苯甲基嗎啉-2-基)甲酯



向含1-Boc-4-哌啶(1 g, 5 mmol)之DCM(20 ml)中添加休尼格鹼(1.74 ml, 10 mmol)，繼而添加3,4,5-三甲氧基苄醯氯(1.38 g, 6 mmol)。在室溫下使反應進行3小時，濃縮以移除溶劑及過量鹼。將殘餘物溶解於EtAc(100 ml)中，以0.05 N HCl(3×15 ml)、飽和NaHCO₃(2×15 ml)洗滌，經Na₂SO₄乾燥。ISCO純化(5% MeOH/DCM)後獲得產物(1)。

向7中添加15 ml 4 N HCl/二噁烷，4小時後終止反應。獲得呈白色固體狀之8。

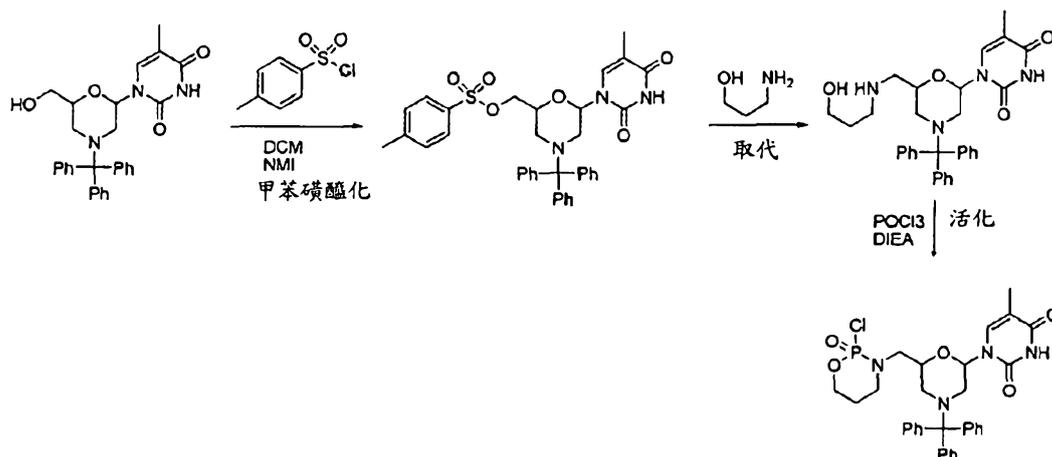
在N₂下，將8(1.23 g, 4.18 mmol)之DCM(20 ml)溶液冷卻至-78 °C。依序緩慢添加磷醯氯(0.39 ml, 4.18 mmol)於DCM(2 ml)中之溶液、Et₃N(0.583 ml, 4.18 mmol)於DCM(2 ml)中之溶液。繼續攪拌，

同時使反應物升溫至室溫隔夜。ISCO純化(50% EtAc/己烷)後獲得所要產物(9)。

在0°C下，向含moT(Tr)(1.933 g, 4.0 mmol)之DCM(20 ml)中添加二甲基吡啶(0.93 ml, 8 mmol)及DMAP(49 mg, 0.4 mmol)，繼而添加9(1.647 g, 4 mmol)。在室溫下攪拌反應物18小時。ISCO純化(50% EtAc/己烷)後獲得所要產物(10)。

實例22

合成含有單元(^{CP}T)之環磷醯胺



使moT單元(25 g)懸浮於DCM(175 ml)中，且添加NMI(N-甲基咪唑，5.94 g, 1.4當量)，獲得澄清溶液。向反應混合物中添加甲苯磺醯氯，且由TLC監測反應進程直至完成(約2小時)。藉由依序用0.5 M檸檬酸緩衝液(pH=5)、鹽水洗滌來進行水性處理。分離有機層，且經Na₂SO₄乾燥。用旋轉蒸發器移除溶劑，獲得粗產物，其未經進一步純化即用於下一步驟中。

將以上製備之moT甲苯磺酸酯與丙醇胺(1 g/10 ml)混合。隨後將反應混合物置於45°C下之烘箱中隔夜，繼而以DCM(10 ml)稀釋。藉由依序用0.5 M檸檬酸緩衝液(pH=5)、鹽水洗滌來進行水性處理。分離有機層，且經Na₂SO₄乾燥。用旋轉蒸發器移除溶劑，獲得粗產物。藉由NMR及HPLC分析粗產物且經測定以備未經進一步純化即用於下

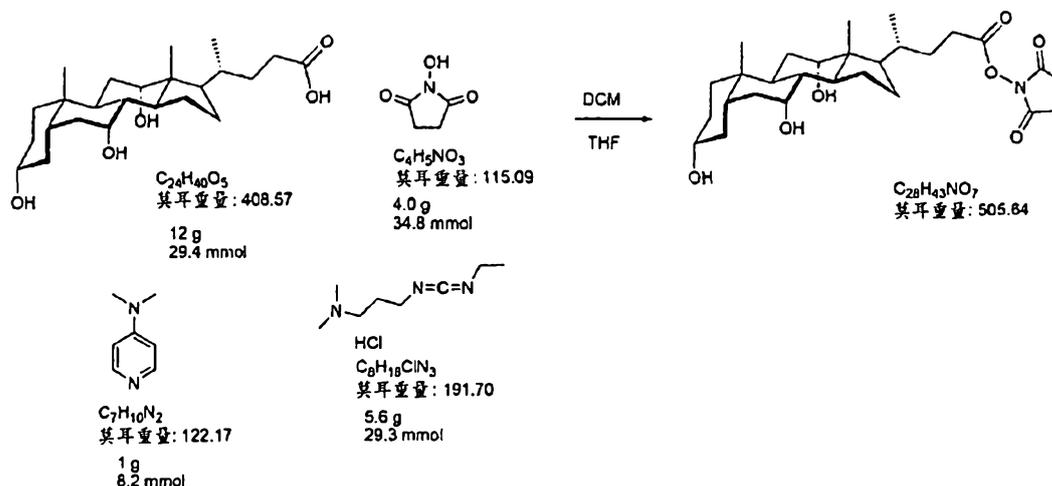
一步驟。

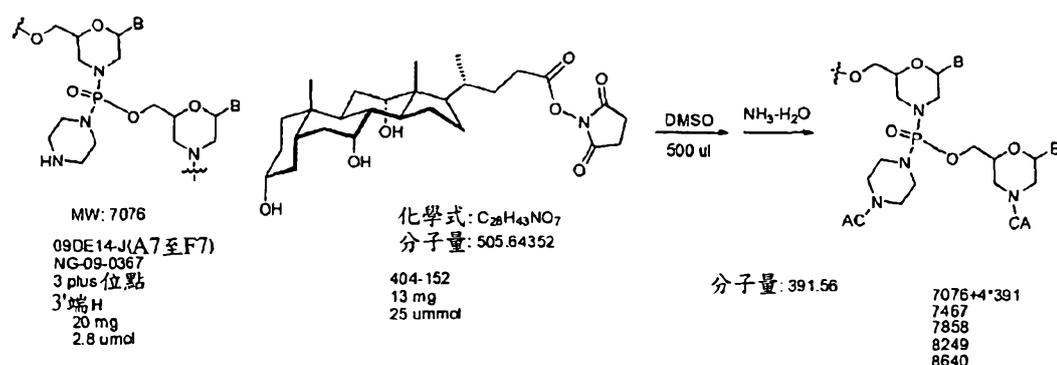
將粗產物溶解於DCM(2.5 ml DCM/g, 1當量)中, 且與DIEA(3當量)混合。以乾冰-丙酮冷卻此溶液, 且逐滴添加POCl₃(1.5當量)。在室溫下攪拌所得混合物隔夜。藉由依序用0.5 M檸檬酸緩衝液(pH=5)、鹽水洗滌來進行水性處理。分離有機層, 且經Na₂SO₄乾燥。用旋轉蒸發器移除溶劑, 獲得呈微黃色固體狀之粗產物。藉由矽膠層析(粗產物/二氧化矽=1:5比率, 梯度DCM至50% EA/DCM)純化粗產物, 且根據TLC分析彙集溶離份。移除溶劑, 獲得呈非對映異構體混合物形式之所要產物。藉由HPLC(NPP淬滅)及NMR(H-1及P-31)分析經純化之產物。

根據以下程序分離非對映異構體混合物。將混合物(2.6 g)溶解於DCM中。將此樣品加載於RediSepRf管柱(80 g, 由Teledyne Isco製造之正相管柱)上, 且歷經20分鐘以10% EA/DCM至50% EA/DCM溶離。收集溶離份且由TLC分析。根據TLC分析彙集溶離份, 且在室溫下用旋轉蒸發器移除溶劑。藉由P-31 NMR及NPP-TFA分析測定所彙集之溶離份的非對映異構體比率。需要時, 重複上述程序直至非對映異構體比率達到97%為止。

實例23

PMOplus之整體膽酸修飾





根據以下程序製備了二醯亞胺活化之膽酸衍生物。將膽酸(12 g, 29.4 mmol)、N-羥基丁二醯亞胺(4.0 g, 34.8 mmol)、EDCI(5.6 g, 29.3 mmol)及DMAP(1 g, 8.2 mmol)饋入圓底燒瓶中。添加DCM(400 ml)及THF(40 ml)至溶解。在室溫下攪拌反應混合物隔夜。隨後向反應混合物中添加水(400 ml), 分離有機層, 且依序用水(2×400 ml)、飽和NaHCO₃(300 ml)及鹽水(300 ml)洗滌。隨後經Na₂SO₄乾燥有機層。用旋轉蒸發器移除溶劑, 獲得白色固體。將粗產物溶解於氯仿(100 ml)中且沈澱至庚烷(1000 ml)中。藉由過濾收集固體, 藉由HPLC及NMR分析, 且未經進一步純化即使用。

將適量PMOplus(20 mg, 2.8 μmol)稱重添加至小瓶(4 ml)中, 且溶解於DMSO(500 μl)中。根據每個修飾位點處2當量活性酯之比率向反應混合物中添加活化膽酸酯(13 mg, 25 μmol), 繼而在室溫下攪拌隔夜。藉由MALDI及HPLC(C-18或SAX)確定反應進程。

反應完成(如由起始PMOplus消失所確定)之後, 反應一旦完成即向反應混合物中添加1 ml濃氨。隨後將反應小瓶置於烘箱(45°C)中隔夜(18小時), 繼而冷卻至室溫且以1%氨水(10 ml)稀釋。將此樣品加載至SPE管柱(2 cm)上, 且以1%氨溶液(2×2 ml)沖洗小瓶。以1%氨水(3×6 ml)洗滌SPE管柱, 且以含45%乙腈之1%氨水(6 ml)溶離產物。藉由UV光學密度量測鑑別含有寡聚物之溶離份。藉由凍乾分離產物。

藉由MALDI及HPLC(C-18及/或SAX)確定純度及身分。

此上述程序適用於去氧膽酸活化及與PMO⁺結合。

實例24

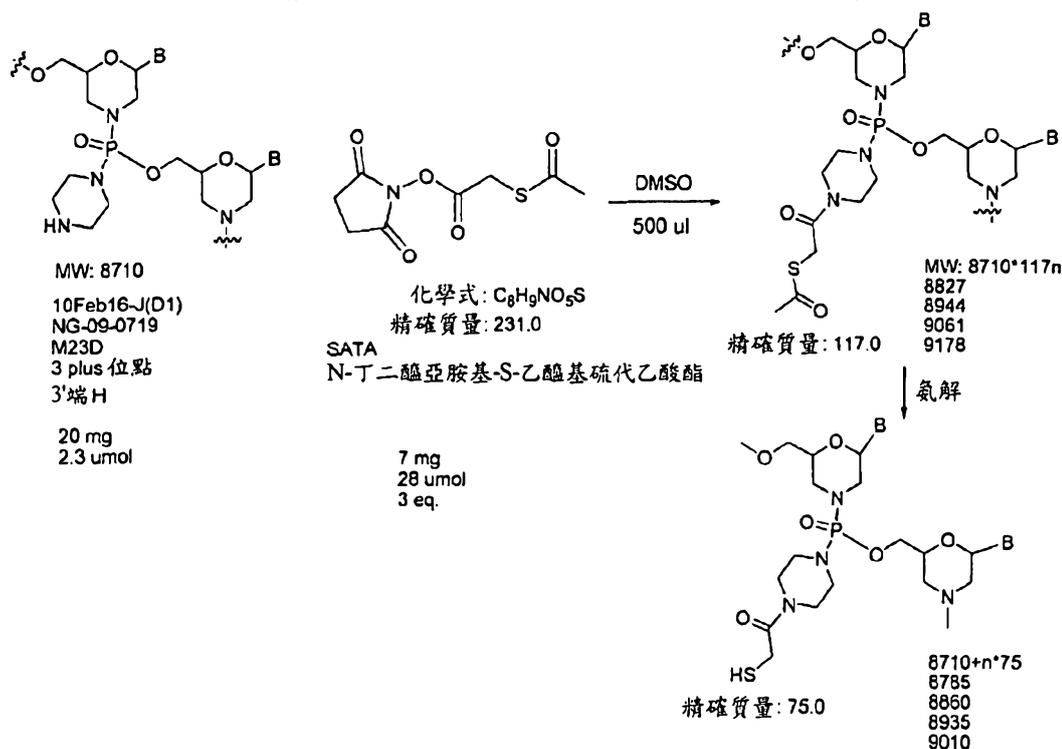
PMOplus之整體胍基化

將適量PMOplus(25 mg, 2.8 μmol)稱重添加至小瓶(6 ml)中。向小瓶中添加1H-吡啶-1-脒氯化物(15 mg, 102 μmol)及碳酸鉀(20 mg, 0.15 mmol)。添加水(500 μl), 且在室溫下攪拌反應混合物隔夜(約18小時)。藉由MALDI確定反應完成。

一旦完成, 即以1%氨水(10 ml)稀釋反應物, 且加載至SPE管柱(2 cm)上。以1%氨溶液(2×2 ml)沖洗小瓶, 且以1%氨水(3×6 ml)洗滌SPE管柱。以含45%乙腈之1%氨水(6 ml)溶離產物。藉由UV光學密度量測鑑別含有寡聚物之溶離份。藉由凍乾分離產物。藉由MALDI及HPLC(C-18及/或SAX)確定純度及身分。

實例25

PMOplus之整體硫乙醯基修飾(M23D)

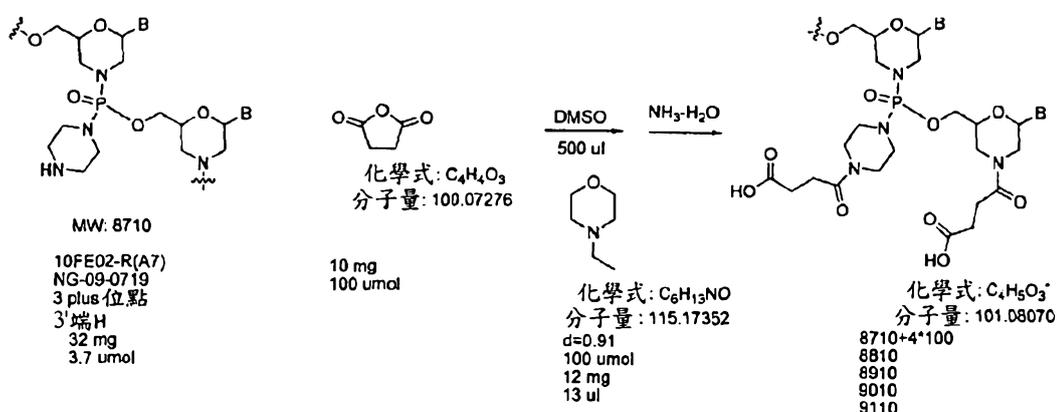


將適量PMOplus(20 mg, 2.3 μ mol)稱重添加至小瓶(4 ml)中，且溶解於DMSO(500 μ l)中。向反應混合物中添加N-丁二醯亞胺基-S-乙醯基硫代乙酸酯(SATA)(7 mg, 28 μ mol)，且在室溫下攪拌隔夜。藉由MALDI及HPLC監測反應進程。

一旦完成，即向反應混合物中添加1%氨水，且在室溫下攪拌2小時。將此溶液加載至SPE管柱(2 cm)上。以1%氨溶液(2 \times 2 ml)沖洗小瓶，且以1%氨水(3 \times 6 ml)洗滌SPE管柱。以含45%乙腈之1%氨水(6 ml)溶離產物。藉由UV光學密度量測鑑別含有寡聚物之溶離份。藉由凍乾分離產物。藉由MALDI及HPLC(C-18及/或SAX)確定純度及身分。

實例26

PMOplus之整體丁二酸修飾

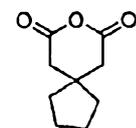


將適量PMOplus(32 mg, 3.7 μ mol)稱重添加至小瓶(4 ml)中，且溶解於DMSO(500 μ l)中。向反應混合物中添加N-乙基嗎啉(12 mg, 100 μ mol)及丁二酸酐(10 mg, 100 μ mol)，且在室溫下攪拌隔夜。藉由MALDI及HPLC監測反應進程。

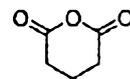
一旦完成，即向反應混合物中添加1%氨水，且在室溫下攪拌2小時。將此溶液加載至SPE管柱(2 cm)上。以1%氨溶液(2 \times 2 ml)沖洗小瓶，且以1%氨水(3 \times 6 ml)洗滌SPE管柱。以含45%乙腈之1%氨水(6 ml)溶離產物。藉由UV光學密度量測鑑別含有寡聚物之溶離份。藉由

凍乾分離產物。藉由MALDI及HPLC(C-18及/或SAX)確定純度及身分。

上述程序亦適用於PMOplus之戊二酸(戊二酸酐)及四亞甲基戊二酸(四亞甲基戊二酸酐)修飾。



四亞甲基戊二酸酐



戊二酸酐

實例27

以本發明之例示性PMO寡聚物處理MDX小鼠

MDX小鼠為公認且經充分表徵之杜興氏肌肉營養不良(DMD)動物模型，其在肌縮蛋白基因之外顯子23中含有突變。已知M23D反義序列(SEQ ID NO:15)誘導外顯子23跳越及功能性肌縮蛋白表現恢復。藉由尾靜脈注射，以M23D PMO+寡聚物(NG-09-0711、NG-10-0055、NG-10-0056)或含有4-胺基哌啶基連結(含有上文所述及圖2中所示之PMO^{apn}連結的NG-10-0070)及4-丁二醯胺基哌嗪基連結(含有上文所述及圖2中所示之PMO^{suc}連結的NG-10-0105)之兩種PMO化合物對MDX小鼠給藥一次(50 mg/kg)。與肽結合之PMO(PPMO)在實驗中用作陽性對照(AVI-5225；SEQ ID NO: 16)。所有經測試寡聚物皆具有相同反義序列，但連結或肽之類型不同(在AVI-5225之情況下，參見表8)。注射後一週，處死MDX小鼠，且自各種肌肉組織中提取RNA。使用端點PCR來測定含有外顯子23之肌縮蛋白mRNA及由於反義誘導之外顯子跳越而缺乏外顯子23之mRNA的相對豐度。外顯子23跳越百分比為活體內反義活性之量度。圖5展示處理後一週自四頭肌而得之結果。含有四種陽離子性4-胺基哌啶基連結之NG-10-0070與任何PMO+化合物(NG-10-0055、NG-10-0056及NG-10-0057)相比展示活性增加兩倍。含有四種陰離子性4-丁二醯胺基哌嗪基連結之NG-10-0105化合物與

PMO+寡聚物相比具有同等活性。如預期，AVI-5225 PPMO(與肽結合)化合物因細胞穿透性傳遞肽而最為有效。媒劑及WT C57(野生型小鼠)處理為陰性對照且不表現外顯子23跳越之肌縮蛋白mRNA。

表8. 實例27之序列

名稱	序列(5'至3')	SEQ ID NO
M23D	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	15
NG-09-0711	GGC CAA ACC +TCG GC+T TAC C+TG AAA +T	N/A
NG-10-0055	GGC C ⁺ AA ⁺ ACC ⁺ TCG GC ⁺ T TAC C ⁺ TG AAA T	N/A
NG-10-0056	GGC C ⁺ A ⁺ A ⁺ ACC TCG GCT TAC CTG AAA T	N/A
NG-10-0057	GGC CAA ACC TCG GCT TAC C ⁺ TG ⁺ A ⁺ A ⁺ A T	N/A
NG-10-0070	GGC CAA ACC ^{apn} TCG GC ^{apn} T TAC C ^{apn} TG AAA ^{apn} T	N/A
NG-10-0105	GGC CAA ACC ^{suc} TCG GC ^{suc} T TAC C ^{suc} TG AAA T	N/A
AVI-5225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT- RAhxRRBRRAhxRRBRRAhxB	16

使用在M23D PMO內且用於如上文所述之MDX小鼠模型中的較大範圍之經修飾之單元間連結進行支持本發明之其他實驗。具有連結之寡聚物之子組如上文於表7中列出。圖6展示自此擴展篩選而得之結果且顯示具有最高活性之M23D寡聚物為分別包含連結b10、b54、b10及b10之NG-10-0070、NG-10-0104、NG-10-0095及NG-10-0133(在圖6中，x軸上之標記對應於化合物ID#之最後3個數位)。MDX小鼠接受50 mg/kg劑量之單次靜脈內注射。圖6中所示之其他活性化合物為包含末端修飾之M23D PMO且於上文描述於表6中。將所有化合物與不含任何單元間修飾或末端修飾(SEQ ID NO:15)之PMO相比較。

支持本發明之其他實驗使用具有單元間修飾及末端連結之化合物的更大擴展。單元間連結修飾於上文展示於表9中。使用彼等化合物之結果於下文展示於表9中。結果以表頂部為最具活性化合物為序。

表9. 來自經本發明之PMO-X化合物處理之MDX小鼠之
四頭肌及膈膜組織中的外顯子23跳越

NG #	PMO-X修飾	劑量	外顯子跳越%	
			四頭肌	膈膜
		mg/kg		
NG-10-0383	PMO	30	61	20
NG-10-0325	三苯磷基	30	54	46
NG-10-0272	PMO-法呢基	30	48	14
NG-10-0102	PMO	30	44	23
NG-10-0330	三甲氧基苄醯基	30	40	7
NG-10-0056	PMOplus 5'-pol	23	40	13
NG-07-0064	PMO-3'-三苯甲基	30	37	24
NG-10-0382	PMO	30	36	18
NG-10-0278	PMOpyr	26	35	29
NG-10-0210	PMOapn	31	34	19
NG-10-0098	PMOpyr	30	31	19
NG-10-0070	PMOapn	30	30	10
NG-10-0095	PMOapn	30	30	11
NG-10-0317	PMO	30	30	17
NG-10-0477	PMO triMe Gly	30	28	32
NG-10-0133	PMOapn	30	28	17
NG-10-0387	PMO	30	28	25
NG-10-0104	PMOguan	30	27	14
NG-10-0420	PMOplus甲基	29	27	25
NG-10-0065	PMOtri	30	26	2
NG-10-0607	PMO-X	30	25	19
NG-10-0060	PMOcp	30	25	6
NG-10-0162	PMO-COCH ₂ SH	30	25	8
NG-10-0328	二苯基乙醯基	30	25	20
NG-10-0134	PMOapnPMOtri	30	23	2
NG-10-0386	PMO	30	22	11
NG-07-0064	PMO-3'-三苯甲基	30	22	23
NG-10-0059	PMOcp	30	22	9
NG-10-0135	PMOtri	30	21	19

NG-10-0168	PMOapn PMOcys	30	21	6
NG-10-0113	PMOapnPMOtri	30	20	20
NG-10-0385	PMO	30	20	32
NG-10-0279	PMO	30	19	22
NG-10-0055	PMOplus <i>disp</i>	30	17	11
NG-10-0105	PMOsucc	30	16	4
NG-10-0805	PMO-X	30	16	21
NG-10-0811	PMO-X	32	16	6
NG-10-0057	PMOplus 3'- <i>pol</i>	30	15	16
NG-10-0625	PMO-X	28	15	11
NG-10-0804	Alex二聚體	35	15	11
NG-10-0066	PMOtri	30	12	1
NG-10-0280	PMO二硫化物	30	12	14
NG-10-0212	PMOapn	20	11	15
NG-10-0156	3'-MeO三苯甲基	30	10	22
NG-10-0062	PMOhex	30	9	10
NG-11-0043	PMO-X	30	9	16
NG-10-0206	PMOplus	31	8	10

實例28

以本發明之例示性PMO寡聚物處理轉殖基因eGFP小鼠

支持本發明之實驗使用針對活體內反義活性的基於eGFP之檢定且用於評估包含本發明之經修飾單元間連結之寡聚物。已描述其中eGFP-654 轉殖基因在整個體內均勻表現之轉殖基因eGFP小鼠模型(Sazani, Gemignani等人, 2002)。此模型使用針對活性之剪接檢定, 其中本發明之經修飾寡聚物阻斷異常剪接且恢復經修飾且經增強之綠色螢光蛋白(eGFP)前mRNA之正確剪接。在此方法中, 各寡聚物之反義活性與eGFP報導體之上調成正比。因此, 相同寡聚物之功能效應可在幾乎所有組織中監測。此與靶向其表現僅限於某些組織中或僅在某些組織中表型相關之基因的寡聚物成對比。在eGFP-654小鼠中, 前mRNA可容易在所有組織中偵測到, 但在骨髓、皮膚及腦中發現較少

量。經轉譯eGFP之量與反義寡聚物之效能及其在作用位點處之濃度成比例。自各種組織中分離之總RNA的RT-PCR展示eGFP-654轉錄物在所有檢查組織中之表現。

在給藥後8天自經5至150 mg/kg範圍內之化合物處理之eGFP-654小鼠(n=6)收集組織且於-80°C下冷凍。在即將於GE Typhoon Trio上成像之前解凍組織，以PBS噴霧，且直接於掃描器之玻璃壓板上排成陣列。使用488 nm激發雷射及在壓板表面處具有焦平面之520 nm BP 40發射濾光片進行50微米掃描以收集eGFP螢光。使用ImageQuant分析組織掃描以測定穿過各組織之平均螢光。對來自僅經媒劑處理之3至5隻小鼠的組織螢光求平均以得到各組織類型之固有背景螢光量測值。以媒劑組織螢光之分數計算來自經化合物處理之小鼠之相應組織的倍數螢光值。圖7B-C展示含有分別含有連結b54及b11之本發明例示性單元間連結NG-10-0110及NG-10-0323的兩種PMO在eGFP-654小鼠模型中之組織特異性活性。所有經測試之寡聚物皆來源於eGFP654序列(SEQ ID NO: 17)。為作比較，圖7A中展示使用具有相同序列，但缺乏任何單元間修飾之PMO的結果。NG-10-0110(SEQ ID NO:17)在四頭肌中具有高活性且在肝中具有較差活性(圖7B)，而NG-10-0323具有改良之肝活性及肌肉傳遞(圖7C)。

支持本發明之其他實例包括使用以本發明之連結及末端基團修飾之eGFP(SEQ ID NO:17)寡聚物的實驗。如圖11及圖12中所示，與PMO及PMOplus寡聚物相比，若干經修飾之寡聚物在來自如上文所述經處理之小鼠的各種組織中展示改良之eGFP剪接校正活性。

此實例中所述之化合物之特異性PMO-X修飾展示於下表10中。

表10. 實例28中所用之展示連結類型之序列

NG-10-0110	GC ^{guan} T AT ^{guan} T ACC T ^{guan} TA ACC CAG
NG-10-0323	GC ^{pyr} T AT ^{pyr} T ACC T ^{pyr} TA ACC CAG
PMOplus ; NG-10-0301	GC+T AT+T ACC +TTA ACC CAG
NG-10-0248	GCaT AaTaT ACC aTaTA ACC CAG
NG-10-0600 *	GCaT ATaT ACC TaTA ACC CAG
NG-10-0602 **	GCpT ATpT ACC TpTA ACC CAG
NG-10-0389	GCX ATX ACC TXA ACC CAG
NG-10-0247	GCpT ApTpT ACC TpTA ACC CAG
NG-10-0299	GCaT ATaT ACC TaTA ACC CAG
NG-10-0355 ***	GCaT ATaT ACC TaTA ACC CAG

*來自NG-10-0299之三甲基甘胺酸醯化產物；**pT=PMOpyr，自NG-10-0323甲基化成四級胺；X=PMOapn；*** 3'三苯甲基

實例29

以本發明之例示性PMO寡聚物處理受A型流感病毒感染之細胞製備一系列含有各種經修飾之單元間連結之PMO且用於處理培養物中受A型流感病毒感染之細胞。PMO及含有本發明之經修飾單元間連結之PMO皆旨在靶向AUG起始密碼子處之病毒M1/M2區段且具有兩個鹼基序列(SEQ ID NO: 3及4)之一。具有本發明之經修飾單元間連結之PMO列於表4中且由下文序列表中NG編號代碼鑑別。藉由反義靶向M1/M2區段內之多個位點來抑制A型流感病毒複製描述於共同擁有且同在申請中之美國申請案第12/945,081號中，該案以全文引用的方式併入本文中。除了藉由靶向共同M1/M2 AUG起始位點來抑制轉譯以外，亦可使用本發明之化合物靶向剪接供體及剪接受體位點。

用H1N1(病毒株PR8)以0.1 MOI感染泡狀鼠類巨噬細胞細胞株(ATCC ; AMJ2-C11)，且感染後1小時添加PMO。在35°C下培育細胞隔夜。隨後獲取病毒上清液，且與VNAR蛋白酶一起培育以釋放病毒

RNA。藉由定量即時PCR(qRT-PCR)定量HA RNA。洗滌細胞，固定且經滲透。隨後在37°C下以單株抗體探測M1及M2蛋白質30分鐘。洗滌細胞，且在室溫下歷時15分鐘添加與Alexa 646結合之抗小鼠IgG。隨後藉由流動式細胞測量術檢定M1及M2。為測定M1及M2蛋白質含量，將M1或M2陽性細胞之百分比乘以M1或M2之平均螢光強度。隨後將各樣品除以未經處理之對照，以產生與未經處理之零亂對照相比M1或M2之百分比。

圖8展示經本發明之各種化合物處理之細胞的病毒M2蛋白質含量降低。上文所述之流動式細胞測量法用於測定處理後60微莫耳濃度下之相對M2蛋白質表現。寡聚物不同程度地抑制M2蛋白質產生，其中含有連結b1之NG-10-180(SEQ ID NO: 3)最具活性。使用不含任何單元間修飾之PMO的結果於圖8中以NG-10-0015(SEQ ID NO:3)展示以供比較。

實例30

以本發明之例示性PMO寡聚物活體內處理受A型流感病毒感染之小鼠

使用受A型流感之PR8病毒株感染之Balb/c小鼠進行支持本發明之其他實驗。在4小時前以本發明之PMO-X化合物處理之後，經由鼻內接種以3.5 TCID₅₀感染小鼠。在一些實驗中，在感染後96小時投與另一劑量之PMO-X。所有劑量皆由含100微克測試化合物之50微升PBS組成且係藉由鼻內吹入投與。每天監測動物重量且用作抗病毒藥物活性之臨床終點。感染後第7天，處死動物且收集肺以使用上文實例29中所述之qRT-PCR方法測定病毒負荷。

使用肺組織勻漿之半對數連續稀釋液進行TCID₅₀測定且將其塗於AMJ-C12巨噬細胞上。在35°C下24小時後，更換培養基且在35°C下再培育72小時。添加50 mL之0.5%雞RBC之PBS溶液，且在4°C下培育1

小時。讀取血球凝集圖案且使用里德-明奇法(Reed and Muench method)計算TCID₅₀。隨後對TCID₅₀值進行校正以輸入組織重量。

如圖9中所示，在H1N1感染後，PMO-X化合物與PMOplus化合物相比顯示抗病毒活性增加及重量損失減少。以H1N1感染Balb/c小鼠(n=4)，且在感染前4小時單次給與100微克劑量之PMO。每天稱重小鼠，且自感染前重量確定重量損失百分比。感染後第7天收集肺，且由TCID₅₀檢定病毒負荷。結果表示為抗病毒活性相對於裸PMO之增加倍數。此實驗展示兩種PMO-X化合物(NG-10-0097及NG-11-0173；SEQ ID NO:3)之抗病毒活性與未經修飾之PMO(NG-10-0015；SEQ ID NO:3)相比增加約50倍，且與PMOplus化合物(NG-11-0170；SEQ ID NO:3)相比活性約高10倍。

圖10展示類似於圖9所述之實驗，其使用體重作為抗病毒活性之臨床量度。相對於PMOplus化合物(NG-11-0170)，若干PMO-X化合物展示較佳結果，包括含有丁二醯基(NG-10-0108)、異丙基哌嗪(NG-11-0148)及吡咯啉酮(NG-11-0173)之化合物及經3'末端二苯甲基(NG-11-0145)修飾之PMOplus化合物。

實例31

製備包含經修飾之末端基團之寡核苷酸類似物

向含有游離3'端之25-mer PMO(27.7 mg, 3.226 μmol)於DMSO(300 μL)中之溶液中添加法呢基溴(1.75 μl, 6.452 μmol)及二異丙基乙胺(2.24 μL, 12.9 μmol)。在室溫下攪拌反應混合物5小時。以10 mL 1% NH₄OH水溶液稀釋粗反應混合物，隨後加載至2 mL Amberchrome CG300 M管柱上。隨後以3管柱體積之水沖洗管柱，且以6 mL 1:1乙腈與水(v/v)溶離產物。隨後凍乾溶液，獲得呈白色固體狀之標題化合物。

實例32

製備嗎啉基寡聚物

製備三苯甲基哌嗪胺基甲酸苯酯35(參見圖3)：向化合物11於二氯甲烷(6 mL/g 11)中之經冷卻懸浮液中添加碳酸鉀(3.2當量)於水(4 mL/g碳酸鉀)中之溶液。向此兩相混合物中緩慢添加氯甲酸苯酯(1.03當量)於二氯甲烷(2 g/g氯甲酸苯酯)中之溶液。使反應混合物升溫至20°C。反應完成時(1至2小時)，分離各層。以水洗滌有機層，且經無水碳酸鉀乾燥。藉由自乙腈中結晶分離產物35。產率=80%。

製備胺基甲酸酯醇36：使氫化鈉(1.2當量)懸浮於1-甲基-2-吡咯啉酮(32 mL/g氫化鈉)中。向此懸浮液中添加三乙二醇(10.0當量)及化合物35(1.0當量)。將所得漿料加熱至95°C。反應完成時(1至2小時)，將混合物冷卻至20°C。向此混合物中添加30%二氯甲烷/甲基第三丁基醚(v:v)及水。依序用NaOH水溶液、丁二酸水溶液及飽和氯化鈉水溶液洗滌含有產物之有機層。藉由自二氯甲烷/甲基第三丁基醚/庚烷中結晶分離產物36。產率=90%。

製備尾部酸(Tail acid)37：向化合物36於四氫呋喃(7 mL/g 36)中之溶液中添加丁二酸酐(2.0當量)及DMAP(0.5當量)。將混合物加熱至50°C。反應完成時(5小時)，將混合物冷卻至20°C，且以NaHCO₃水溶液調整至pH 8.5。添加甲基第三丁基醚，且將產物萃取至水層中。添加二氯甲烷，且以檸檬酸水溶液將混合物調整至pH 3。以pH=3之檸檬酸鹽緩衝液與飽和氯化鈉水溶液之混合物洗滌含有產物之有機層。37之此二氯甲烷溶液未經分離即用於製備化合物38。

製備38：向化合物37之溶液中添加N-羥基-5-降冰片烯-2,3-二甲酸醯亞胺(HONB)(1.02當量)、4-二甲基胺基吡啶(DMAP)(0.34當量)，隨後添加1-(3-二甲基胺基丙基)-N'-乙基碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)(1.1當量)。將混合物加熱至55°C。反應完成時(4-5小時)，將混合物冷卻至20°C，且依序用1:1 0.2 M檸檬酸/鹽水及鹽水洗滌。將二氯甲烷溶

液之溶劑換成丙酮，隨後換成N,N-二甲基甲醯胺，且藉由自丙酮/N,N-二甲基甲醯胺沈澱至飽和氯化鈉水溶液中來分離產物。將粗產物於水中再漿化數次以移除殘餘N,N-二甲基甲醯胺及鹽。自化合物36得到之38的產率=70%。藉由用於在固相合成期間併入單元之程序在NMP中將活化「尾部」引至二硫化物錨樹脂上。

製備用於合成嗎啉基寡聚物之固體支撐物：在具有粗孔隙率(40-60 μm)玻璃粉、頂置式攪拌器及三通鐵氟龍活栓(3-way Teflon stopcock)之矽烷化加套肽容器(由ChemGlass, NJ, USA定製)中進行此程序，以允許 N_2 向上鼓泡通過玻璃粉或真空萃取。由循環水浴達成反應容器中之溫度控制。

以下程序中之樹脂處理/洗滌步驟由兩個基本操作組成：樹脂流體化及溶劑/溶液萃取。對於樹脂流體化，定位活栓以允許 N_2 向上流動通過玻璃粉，且向反應器中添加特定樹脂處理/洗滌液且使得可滲透並完全潤濕樹脂。隨後開始混合，且將樹脂漿料混合特定時間。對於溶劑/溶液萃取，停止混合及 N_2 流動，且啟動真空泵，隨後定位活栓以允許排空樹脂處理/洗滌液至廢棄。除非另有註釋，否則所有樹脂處理/洗滌體積為每公克樹脂15毫升。

向矽烷化加套肽容器中之胺基甲基聚苯乙烯樹脂(100-200目；約1.0 mmol/g N_2 取代；75 g，1當量，Polymer Labs，UK，件號1464-X799)中添加1-甲基-2-吡咯啉酮(NMP；20 ml/g樹脂)，且在混合下使樹脂膨脹1至2小時。排空膨脹溶劑後，以二氯甲烷(2 \times 1-2分鐘)、含5%二異丙基乙胺之25%異丙醇/二氯甲烷(2 \times 3-4分鐘)及二氯甲烷(2 \times 1-2分鐘)洗滌樹脂。排空最終洗滌液後，以二硫化物錨34於1-甲基-2-吡咯啉酮中之溶液(0.17 M；15 mL/g樹脂，約2.5當量)使樹脂流體化，且在45 $^\circ\text{C}$ 下加熱樹脂/試劑混合物60小時。反應完成時，中止加熱且排空錨溶液，且以1-甲基-2-吡咯啉酮(4 \times 3-4分鐘)及二氯甲烷(6 \times 1-2分

鐘)洗滌樹脂。以10%(v/v)二碳酸二乙酯於二氯甲烷中之溶液(16 mL/g; 2×5-6分鐘)處理樹脂，隨後以二氯甲烷(6×1-2分鐘)洗滌。在N₂流下乾燥樹脂39(參見圖4)，持續1至3小時，隨後在真空下乾燥至恆重(± 2%)。產率：原始樹脂重量之110-150%。

測定胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂之負荷：藉由針對每公克樹脂三苯基甲基(三苯甲基)數目之光譜檢定來測定樹脂之負荷(潛在可用反應性位點之數目)。

將已知重量之乾燥樹脂(25 ± 3 mg)轉移至矽烷化25 mL量瓶中，且添加約5 mL含2% (v/v)三氟乙酸之二氯甲烷。藉由緩緩渦旋混合內含物，隨後使其靜置30分鐘。再用含2%(v/v)三氟乙酸之二氯甲烷使體積達到25 mL，且充分混合內含物。使用正壓分注滴管(positive displacement pipette)，將含三苯甲基溶液之等分試樣(500 μL)轉移至10 mL量瓶中，且以甲磺酸使體積達到10 mL。

藉由431.7 nm下之UV吸光度量測最終溶液中之三苯甲基陽離子含量，且使用適當體積、稀釋度、消光係數(ϵ : 41 $\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)及樹脂重量來計算以每公克樹脂之三苯甲基($\mu\text{mol/g}$)表示之樹脂負荷。一式三份進行檢定且計算平均負荷。

此實例中之樹脂負荷程序將提供具有約500 $\mu\text{mol/g}$ 負荷之樹脂。若在室溫下歷時24小時進行二硫化物錨併入步驟，則獲得300-400 $\mu\text{mol/g}$ 之負荷。

尾部負荷：使用與製備胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂相同之配置及體積，可將尾部引入分子中。對於偶合步驟，使用38(0.2 M)於含有4-乙基嗎啉(NEM, 0.4 M)之NMP中之溶液替代二硫化物錨溶液。在45°C下2小時後，以含5%二異丙基乙胺之25%異丙醇/二氯甲烷洗滌樹脂39兩次，且以DCM洗滌一次。向樹脂中添加苯甲酸酐(0.4 M)與NEM(0.4 M)之溶液。25分鐘後，將反應器夾套冷卻至室溫，且

以含5%二異丙基乙胺之25%異丙醇/二氯甲烷洗滌樹脂兩次並以DCM洗滌八次。過濾樹脂40且在高真空下乾燥。將樹脂40之負荷定義為用於尾部負荷之原始胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂39之負荷。

固相合成：在Gilson AMS-422自動化肽合成器上於2 mL Gilson聚丙烯反應管柱(件號3980270)中製備嗎啉基寡聚物。當管柱位於合成器上時，將具有水流通道之鋁塊置放於管柱周圍。或者，AMS-422將添加試劑/洗滌溶液，保持特定時間且使用真空排空管柱。

對於長度在至多約25個單元範圍內之寡聚物，具有接近500 $\mu\text{mol/g}$ 樹脂之負荷的胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂較佳。對於較大寡聚物，具有300-400 $\mu\text{mol/g}$ 樹脂之負荷的胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂較佳。若需要具有5'-尾部之分子，則以相同負荷原則選擇已負荷尾部之樹脂。

製備以下試劑溶液：

脫除三苯甲基溶液：含10%氰基乙酸(w/v)之4:1二氯甲烷/乙腈；中和溶液：含5%二異丙基乙胺之3:1二氯甲烷/異丙醇；偶合溶液：含0.18 M(或0.24 M，對於已生長多於20個單元之寡聚物)具有所要鹼基及連結類型之活化嗎啉基單元及0.4 M N-乙基嗎啉之1,3-二甲基咪唑啉酮。使用二氯甲烷(DCM)作為分離不同試劑溶液洗滌液之過渡洗滌液。

在合成器上，在區塊設定為42°C下，向含有30 mg胺基甲基聚苯乙烯-二硫化物樹脂(或尾部樹脂)之各管柱中添加2 mL 1-甲基-2-吡咯啉酮，且使其在室溫下靜置30分鐘。以2 mL二氯甲烷洗滌2次後，採用以下合成循環：

步驟	體積	傳遞	保持時間
脫除三苯甲基	1.5 mL	歧管	15秒
脫除三苯甲基	1.5 mL	歧管	15秒

脫除三苯甲基	1.5 mL	歧管	15秒
脫除三苯甲基	1.5 mL	歧管	15秒
脫除三苯甲基	1.5 mL	歧管	15秒
脫除三苯甲基	1.5 mL	歧管	15秒
脫除三苯甲基	1.5 mL	歧管	15秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
偶合	350 μ L-500 μ L	針筒	40分鐘
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
中和	1.5 mL	歧管	30秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒
DCM	1.5 mL	歧管	30秒

將個別寡聚物之順序程式設計至合成器中以使得各管柱以適當順序接受適當偶合溶液(A、C、G、T、I)。當管柱中之寡聚物已完成其最終單元之併入時，自區塊移除管柱且以包含含有0.89 M 4-乙基嗎啉之4-甲氧基三苯基甲基氯(0.32 M，於DMI中)的偶合溶液手動進行最終循環。

鹼基及主鏈保護基自樹脂裂解並移除：在甲氧基三苯甲基化之

後，以2 mL 1-甲基-2-吡咯啉酮洗樹脂8次。添加1 mL由0.1 M 1,4-二硫蘇糖醇(DTT)及0.73 M三乙胺於1-甲基-2-吡咯啉酮中組成之裂解溶液，將管柱加蓋，且使其在室溫靜置30分鐘。然後，將溶液滴流至12 mL威頓小瓶(Wheaton vial)中。以300 μ L裂解溶液洗大幅收縮之樹脂兩次。向溶液中添加4.0 mL濃氨水(儲存於-20°C)，將小瓶蓋緊(使用鐵氟龍襯裡螺紋蓋(Teflon lined screw cap))，且使混合物渦漩以混合溶液。將小瓶置於45°C烘箱中16-24小時以實現鹼基及主鏈保護基之裂解。

初始寡聚物分離：自烘箱移除小瓶裝氨解溶液且使其冷卻至室溫。該溶液以20 mL 0.28%氨水稀釋且通過含有Macroprep HQ樹脂(BioRad)之2.5 \times 10 cm管柱。使用鹽梯度(A：0.28%氨，及B：1 M氯化鈉於0.28%氨中；0-100% B，在60分鐘內)溶離含甲氧基三苯甲基之峰。彙集合併之溶離份且視所要產物進一步處理。

嗎啉基寡聚物之脫除甲氧基三苯甲基：以1 M H₃PO₄處理自Macroprep純化彙集之溶離份以使pH降至2.5。初始混合之後，樣品於室溫靜置4分鐘，屆時以2.8%氨/水中和至pH 10-11。藉由固相萃取(SPE)純化產物。

將Amberchrome CG-300M(Rohm and Haas；Philadelphia, PA)(3 mL)裝填至20 mL燒結管柱(BioRad Econo-Pac層析管柱(732-1011))中，且以3 mL以下物質沖洗樹脂：0.28% NH₄OH/80%乙腈；0.5 M NaOH/20%乙醇；水；50 mM H₃PO₄/80%乙腈；水；0.5 NaOH/20%乙醇；水；0.28% NH₄OH。

將脫除甲氧基三苯甲基之溶液加載至管柱上，且以3-6 mL 0.28%氨水沖洗樹脂三次。將威頓小瓶(12 mL)置於管柱下方，且以2 mL含45%乙腈之0.28%氨水洗兩次來溶離產物。在乾冰中冷凍溶液，且將小瓶置於冷凍乾燥器中以產生鬆散白色粉末。將樣品溶解於水中，使

用針筒經0.22 微米過濾器(Pall Life Sciences, Acrodisc 25 mm針筒過濾器，具有0.2微米HT Tuffryn膜)過濾，且在UV分光光度計上測量光學密度(OD)以測定所存在寡聚物之OD單位，以及分配樣品以供分析。隨後將溶液放回威頓小瓶中以凍乾。

分析嗎啉基寡聚物：使用MALDI-TOF質譜法來確定純化中溶離份之組成，且提供寡聚物身分(分子量)之證據。在以3,5-二甲氧基-4-羥基肉桂酸(芥子酸)、3,4,5-三羥基苯乙酮(THAP)或 α -氰基-4-羥基肉桂酸(HCCA)之溶液作為基質進行稀釋之後，操作樣品。

使用 Dionex ProPac SCX-10，4×250 mm 管柱 (Dionex Corporation；Sunnyvale, CA)，使用25 mM pH=5乙酸鈉、25%乙腈(緩衝液A)及25 mM pH=5乙酸鈉、25%乙腈、1.5 M氯化鉀(緩衝液B)(梯度10-100% B，在15分鐘內)或25 mM KH₂PO₄、25%乙腈(pH=3.5)(緩衝液A)及25 mM KH₂PO₄、25%乙腈(pH=3.5)及1.5 M氯化鉀(緩衝液B)(梯度0-35% B，在15分鐘內)，進行陽離子交換(SCX)HPLC。前一系統用於不連接肽之帶正電荷寡聚物，而後者用於肽結合物。

藉由陽離子交換層析純化嗎啉基寡聚物：將樣品溶解於20 mM乙酸鈉(pH=4.5，緩衝液A)中，且施加於Source 30陽離子交換樹脂(GE Healthcare)之管柱，且以含0.5 M氯化鈉之20 mM乙酸鈉及40%乙腈(pH=4.5，緩衝液B)之梯度溶離。以濃氨水中和所彙集之含有產物之溶離份，且施加於Amberchrome SPE管柱。如上溶離、冷凍並凍乾產物。

表11. 序列表

名稱	序列(5'至3')	SEQ ID NO
登革	CGGTCCACGTAGACTAACAAC	1
JEV	GAAGTTCACACAGATAAACTTCT	2
M1/M2AUG.20.22	CGGTTAGAAGACTCATCTTT	3

M1/M2AUG.25.26	TTTCGACATCGGTTAGAAGACTCAT	4
NP-AUG	GAGACGCCATGATGTGGATGTC	5
小核糖核酸病毒	GAAACACGGACACCCAAAGTAGT	6
登革3'-CS	TCCCAGCGTCAATATGCTGTTT	7
沙粒病毒	GCCTAGGATCCACGGTGCGC	8
RSV-L標靶	GGGACAAAATGGATCCCATTATTAATGGAAATTCTGCTAA	9
RSV-AUG-2	TAATGGGATCCATTTTGTCCC	10
RSV-AUG3	AATAATGGGATCCATTTTGTCCC	11
RSV-AUG4	CATTAATAATGGGATCCATTTTGTCCC	12
RSV-AUG5	GAATTTCCATTAATAATGGGATCCATTTTG	13
RSV-AUG6	CAGAATTTCCATTAATAATGGGATCCATT	14
M23D	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	15
AVI-5225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT- RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	16/79
eGFP654	GCTATTACCTTAACCCAG	17
huMSTN標靶	GAAAAAAGATTATATTGATTTTAAAATCATGCAAAAAGCTG CAACTCTGTGTT	18
muMSTN25-104	CATACATTTGCAGTTTTTGCATCAT	19
muMSTN25-183	TCATTTTTAAAATCAGCACAATCTT	20
muMSTN25-194	CAGTTTTTGCATCATTTTTAAAATC	21
外顯子44-A	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	22
外顯子44-B	AAACTGTTTCAGCTTCTGTTAGCCAC	23
外顯子44-C	TTGTGTCTTTCTGAGAACTGTTCA	24
外顯子45-A	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	25
外顯子45-B	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	26
外顯子45-C	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT	27
外顯子50-A	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	28
外顯子50-B	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCC	29
外顯子50-C	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	30
外顯子51-A	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTTTG	31
外顯子51-B	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	32
外顯子51-C	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	33
外顯子53-A	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	34
外顯子53-B	TGTTCTTGTACTTCATCCACTGATTCTGA	35
SMN2-A	CTTCATAATGCTGGCAG	36

SMN2-B	CATAATGCTGGCAG	37
SMN2-C	GCTGGCAG	38
CAG 9mer	CAG CAG CAG	39
CAG 12mer	CAG CAG CAG CAG	40
CAG 15mer	CAG CAG CAG CAG CAG	41
CAG 18mer	CAG CAG CAG CAG CAG CAG	42
AGC 9mer	AGC AGC AGC	43
AGC 12mer	AGC AGC AGC AGC	44
AGC 15mer	AGC AGC AGC AGC AGC	45
AGC 18mer	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	46
GCA 9mer	GCA GCA GCA	47
GCA 12mer	GCA GCA GCA GCA	48
GCA 15mer	GCA GCA GCA GCA GCA	49
GCA 18mer	GCA GCA GCA GCA GCA GCA	50
AGC 25mer	AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC AGC A	51
CAG 25mer	CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG C	52
CAGG 9mer	CAG GCA GGC	53
CAGG 12mer	CAG GCA GGC AGG	54
CAGG 24mer	CAG GCA GGC AGG CAG GCA GGC AGG	55
富含精胺酸細胞穿透肽		
rTAT	RRRQRRKKR	56
Tat	RKKRRQRRR	57
R ₉ F ₂	RRRRRRRRFF	58
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRFFRRRR	59
R ₄	RRRR	60
R ₅	RRRRR	61
R ₆	RRRRR	62
R ₇	RRRRRR	63
R ₈	RRRRRRR	64
R ₉	RRRRRRRR	65
(RAhxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	66
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	67
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	68

(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFFC	69
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRRGRFFC	70

上述各個實施例可組合以提供其他實施例。本說明書中所提及及/或申請案資料表中所列之所有美國專利、美國專利申請公開案、美國專利申請案、外國專利、外國專利申請案及非專利公開案皆以全文引用的方式併入本文中。必要時，可修改實施例之態樣以採用各種專利、申請案及公開案之概念來提供其他實施例。根據上文詳細描述，可對實施例作出此等及其他變化。一般而言，在以下申請專利範圍中，所用術語不應理解為將申請專利範圍限於本說明書及申請專利範圍中所揭示之特定實施例，而應理解為包括所有可能實施例以及該等申請專利範圍項所授權之等效物的完整範疇。因此，申請專利範圍不受揭示內容限制。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 美商 AVI 生物製藥公司

<120> 具有經修飾之單元間連結及/或末端基團之寡核苷酸類似物

<130> 120178.487TW

<140> 100118810

<141> 2011-05-27

<150> 61/349,783 ; 61/361,878 ; 61/386,428

<151> 2010-05-28 ; 2010-07-06 ; 2010-09-24

<160> 88

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 1
 cggtccacgt agactaaca ct 22

<210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 2
 gaagtcaca cggataaact tct 23

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 3
 cggttagaag actcatcttt 20

<210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 4
 tticgacalc ggltagaaga ctcac 25

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 反義寡聚物
 <400> 5
 gagacgccat gatgtggalg !c 22
 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 6
 gaaacacgga cacccaaagt agt 23
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 7
 tcccagcgtc aatatgcigt tt 22
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 8
 gcctaggatc cacggtgcgc 20
 <210> 9
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 9
 gggacaaaat ggatcccatt attaatggaa attctgctaa 40
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 10
 taatggatc cattttgtcc c 21
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 11
 aataaigggga tccatttltg ccc 23
 <210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 12
 catataaat gggatccatt tigtccc 27

<210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 13
 gaatttccat taataatggg atccattttg 30

<210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 14
 cagaatttcc attaataatg ggatccatt 29

<210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 15
 ggccaaacct cggcttacct gaaat 25

<210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 16
 ggccaaacct cggcttacct gaaat 25

<210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 17
 gctattacct taaccag 18

<210> 18
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 18
 gaaaaagat tatattgatt ttaaaatcat gcaaaaactg caactctlgc tt 52

<210> 19
 <211> 25

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 19
 catacatttg cagtttttgc atcal 25

<210> 20
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 20
 icatttttaa aaatcagcac aatcct 26

<210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 21
 cagtttttgc atcattttta aaaatc 26

<210> 22
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 22
 gatctgtcaa atcgccgtgca gglaa 25

<210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 23
 aaactgltca gcttctgtta gccac 25

<210> 24
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 24
 ttgtgtcitt cigagaaact gtlca 25

<210> 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 25
 ctgacaacag ttlgccgtg cccaa 25

<210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 26
 ccaatgccat cctggagttc ctgtaa 26

<210> 27
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 27
 cattcaatgt tctgacaaca gttgcccgt 30

<210> 28
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 28
 ctacagcct ccaatagttg tcagt 25

<210> 29
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 29
 ccactcagag ctacagatctt ctaacttcc 29

<210> 30
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 30
 gggatccagt atacttacag gctcc 25

<210> 31
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 31
 acatcaagga agatggcatt tctagtttg 30

<210> 32
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反義寡聚物

<400> 32

ciccaacatc aaggaagatg gcatttctag	30
<210> 33	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義寡聚物	
<400> 33	
gagcaggtac ciccaacatc aaggaa	26
<210> 34	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義寡聚物	
<400> 34	
cigaaggigt tcttgtactt catcc	25
<210> 35	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義寡聚物	
<400> 35	
tgttcttgta cttcatccca cigtctcga	30
<210> 36	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義寡聚物	
<400> 36	
ctttcataat gctggcag	18
<210> 37	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義寡聚物	
<400> 37	
cataatgctg gcag	14
<210> 38	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義寡聚物	
<400> 38	
gctggcag	8
<210> 39	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反義寡聚物	

<400> 39 cagcagcag	9
<210> 40 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反義寡聚物	
<400> 40 cagcagcagc ag	12
<210> 41 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反義寡聚物	
<400> 41 cagcagcagc agcag	15
<210> 42 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反義寡聚物	
<400> 42 cagcagcagc agcagcag	18
<210> 43 <211> 9 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反義寡聚物	
<400> 43 agcagcagc	9
<210> 44 <211> 12 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反義寡聚物	
<400> 44 agcagcagca gc	12
<210> 45 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 反義寡聚物	
<400> 45 agcagcagca gcagc	15
<210> 46 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>		
<223>	反義寡聚物	
<400>	46	
	agcagcagca gcagcagc	18
<210>	47	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義寡聚物	
<400>	47	
	gcagcagca	9
<210>	48	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義寡聚物	
<400>	48	
	gcagcagcag ca	12
<210>	49	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義寡聚物	
<400>	49	
	gcagcagcag cagca	15
<210>	50	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義寡聚物	
<400>	50	
	gcagcagcag cagcagca	18
<210>	51	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義寡聚物	
<400>	51	
	agcagcagca gcagcagcag cagca	25
<210>	52	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義寡聚物	
<400>	52	
	cagcagcagc agcagcagca gcagc	25
<210>	53	
<211>	9	
<212>	DNA	

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 53
 caggcaggc 9
 <210> 54
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 54
 caggcaggca gg 12
 <210> 55
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 反義寡聚物
 <400> 55
 caggcaggca ggcaggcagg cagg 24
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 細胞穿透肽
 <400> 56
 Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg
 1 5
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 細胞穿透肽
 <400> 57
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5
 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 細胞穿透肽
 <400> 58
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe
 1 5 10
 <210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 细胞穿透肽

<400> 59
Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 60
Arg Arg Arg Arg
1

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 61
Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 62
Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 63
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 细胞穿透肽

<400> 64
Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<400> 65

Arg
1 5

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 5, 8, 11

<223> Acp

<400> 66

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 5, 8, 11, 14

<223> Acp

<400> 67

Arg Xaa Arg
1 5 10 15

<210> 68

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 8

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 5, 11

<223> bAla

<400> 68

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
1 5 10

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<400> 69

Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Arg Ala Arg Phe Phe Cys
1 5 10 15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<400> 70

Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Arg Gly Arg Phe Phe Cys
1 5 10 15

<210> 71

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<400> 71

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Cys
1 5 10

<210> 72

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<400> 72

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Cys
1 5 10

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 3, 6, 9, 12

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 13

<223> bAla

<400> 73

Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 74

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 5, 8, 11, 13

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 14

<223> bA1a

<400> 74

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 75

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1, 4, 7, 10, 13

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 14

<223> bA1a

<400> 75

Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 4, 6, 8, 10, 12

<223> Acp

<220>

<221> MOD_RES

<222> 13

<223> bA1a

<400> 76

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Xaa
1 5 10

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞透過肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14

<223> Acp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 15
 <223> bAla
 <400> 77
 Arg Xaa Xaa
 1 5 10 15

<210> 78
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 细胞穿透肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 2, 5, 8, 11, 14, 16
 <223> Acp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 17
 <223> bAla

<400> 78
 Arg Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Xaa

<210> 79
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 细胞穿透肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 2, 8, 13
 <223> Acp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> 5, 11, 14
 <223> bAla

<400> 79
 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 80
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 细胞穿透肽

<400> 80
 Arg Arg Arg Arg Arg Gly
 1 5

<210> 81
 <211> 8
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<400> 81

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<400> 82

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly
1 5

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<400> 83

Arg Arg Arg Arg Arg Gly Arg Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<400> 84

Arg Arg Arg Arg Arg Phe Phe Arg Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<400> 85

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 細胞穿透肽

<400> 86

Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly
1 5 10

<210> 87
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 细胞穿透肽

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 2, 8
 <223> Xaa = Ala、 β -丙氨酸、Val、Leu、Ile、Ser、Gly、
 Thr、Phe、Trp及6-氨基己酸

 <400> 87
 Arg Xaa Arg Arg Gly Gly Arg Xaa Arg Arg Gly Gly
 1 5 10

<210> 88
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 细胞穿透肽

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> 2, 6, 8, 12
 <223> Xaa = Ala、 β -丙氨酸、Val、Leu、Ile、Ser、Gly、
 Thr、Phe、Trp及6-氨基己酸

 <400> 88
 Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Arg Xaa Arg Arg Arg Xaa Gly
 1 5 10

發明摘要

※ 申請案號：105121412(由100118810分割)

※ 申請日：100/05/27

※IPC 分類：C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)

【發明名稱】

具有經修飾之單元間連結及/或末端基團之寡核苷酸類似物

OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES HAVING MODIFIED

INTERSUBUNIT LINKAGES AND/OR TERMINAL GROUPS

【中文】

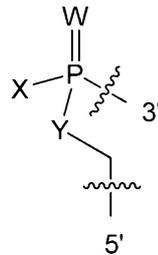
本發明提供包含經修飾之單元間連結及/或經修飾之3'及/或5'-端基團之寡核苷酸類似物。所揭示之化合物適用於治療抑制蛋白質表現或校正異常mRNA剪接產物產生有益治療效果之疾病。

【英文】

Oligonucleotide analogues comprising modified intersubunit linkages and/or modified 3' and/or 5'-end groups are provided. The disclosed compounds are useful for the treatment of diseases where inhibition of protein expression or correction of aberrant mRNA splice products produces beneficial therapeutic effects.

申請專利範圍

1. 一種包含主鏈之寡聚物，該主鏈包含嗎啉基環結構由單元間連結接合之序列，該等單元間連結使一個嗎啉基環結構之3'端與相鄰嗎啉基環結構之5'端接合，其中各嗎啉基環結構結合於鹼基配對部分，使得該寡聚物可依序列特異性方式結合於標靶核酸，其中該等單元間連結具有以下通式結構(I)：



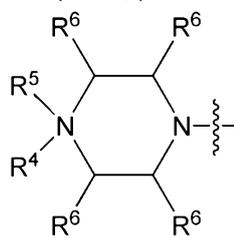
(I)

或其鹽或異構體，且其中該等單元間連結(I)各獨立地為連結(A)或連結(B)：

其中連結(A)：

W在每次出現時獨立地為S或O；

X在每次出現時獨立地為 $-N(CH_3)_2$ 、 $-NR^1R^2$ 、 $-OR^3$ 或；



(II)；

Y在每次出現時獨立地為O或 $-NR^2$ ；

R^1 在每次出現時獨立地為氫或甲基；

R^2 在每次出現時獨立地為氫或 $-LNR^4R^5R^7$ ；

R^3 在每次出現時獨立地為氫或 C_1 - C_6 烷基；

R^4 在每次出現時獨立地為氫、甲基、 $-C(=NH)NH_2$ 、 $-Z-L-$

$\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 或 $-\text{[C}(\text{O})\text{CHR}'\text{NH]}_m\text{H}$ ，其中 Z 為羰基 ($\text{C}(\text{O})$) 或直接鍵， R' 為天然產生之胺基酸之側鏈或其一碳或二碳同系物，且 m 為 1 至 6；

R^5 在每次出現時獨立地為氫、甲基或電子對；

R^6 在每次出現時獨立地為氫或甲基；

R^7 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_6 烷基或 C_1 - C_6 烷氧基烷基；

L 為不存在或連結子，該連結子之長度多至 18 個原子，包含烷基、烷氧基或烷基胺基，或其組合；及

其中連結 (B)：

W 在每次出現時獨立地為 S 或 O；

X 在每次出現時獨立地為 $-\text{NR}^8\text{R}^9$ 或 $-\text{OR}^3$ ；及

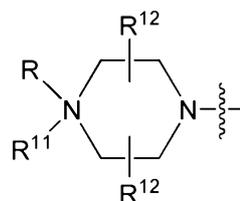
Y 在每次出現時獨立地為 O 或 $-\text{NR}^{10}$ ；

R^8 在每次出現時獨立地為氫或 C_2 - C_{12} 烷基；

R^9 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 芳烷基或芳基；

R^{10} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1 - C_{12} 烷基或 $-\text{LNR}^4\text{R}^5\text{R}^7$ ；

其中 R^8 與 R^9 可接合形成 5-18 員單環或雙環雜環，或 R^8 、 R^9 或 R^3 可與 R^{10} 接合形成 5-7 員雜環，且其中當 X 為 4-哌嗪基時，X 具有以下結構 (III)：



(III)

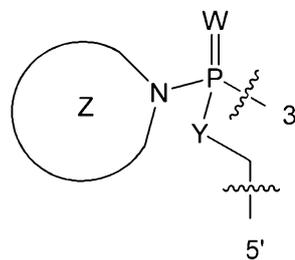
其中：

R^{11} 在每次出現時獨立地為 C_2 - C_{12} 烷基、 C_1 - C_{12} 胺基烷基、 C_1 - C_{12} 烷基羰基、芳基、雜芳基或雜環基；及

R在每次出現時獨立地為電子對、氫或C₁-C₁₂烷基；及

R¹²在每次出現時獨立地為氫、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂胺基烷基、-NH₂、-CONH₂、-NR¹³R¹⁴、-NR¹³R¹⁴R¹⁵、C₁-C₁₂烷基羰基、側氧基(oxo)、-CN、三氟甲基、醯胺基、脒基(amidinyl)、脒基烷基、脒基烷基羰基、胍基、胍基烷基、胍基烷基羰基、膽酸酯基(cholate)、去氧膽酸酯基、芳基、雜芳基、雜環、-SR¹³或C₁-C₁₂烷氧基，其中R¹³、R¹⁴及R¹⁵在每次出現時獨立地為C₁-C₁₂烷基；及

其中該等單元間連結中之至少一者為連結(B)，其具有以下結構(IV)：

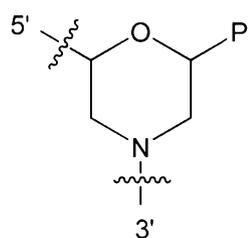


(IV)

其中Z表示5-18員視情況經取代之單環或雙環雜環；或

其中該等單元間連結中之至少一者為連結(B)，其中R⁹為C₁-C₁₂芳烷基或芳基。

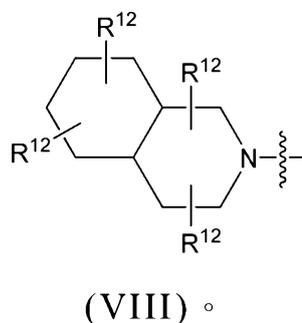
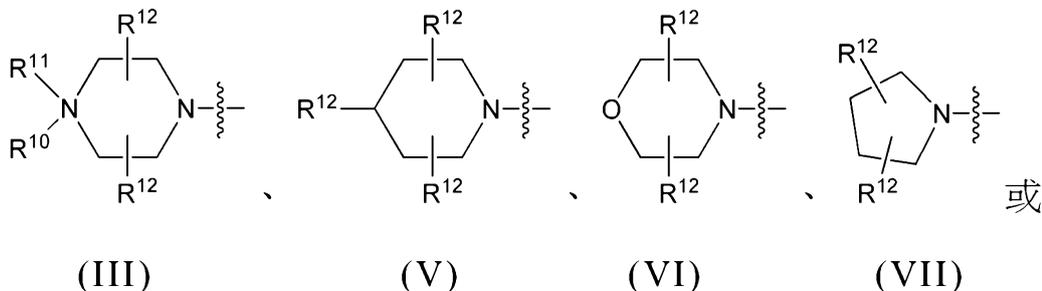
2. 如請求項1之寡聚物，其中該等嗎啉基環結構中之至少一者具有以下結構(i)：



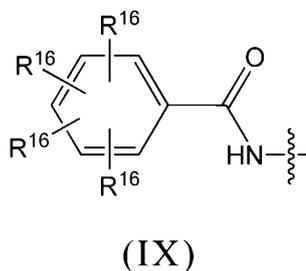
(i)

其中B在每次出現時獨立地為鹼基配對部分。

3. 如請求項1之寡聚物，其中該等單元間連結中之至少一者為連結(A)。
4. 如請求項1之寡聚物，其中X在連結(A)每次出現時為 $-N(CH_3)_2$ 。
5. 如請求項1之寡聚物，其中W及Y在每次出現時為O。
6. 如請求項1之寡聚物，其中Z具有以下結構(III)、(V)、(VI)、(VII)或(VIII)之一：

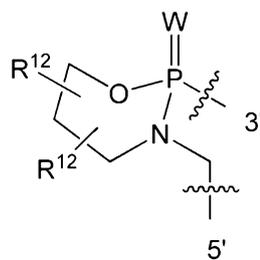


7. 如請求項6之寡聚物，其中Z具有結構(V)。
8. 如請求項6之寡聚物，其中至少一個 R^{12} 具有以下結構(IX)：



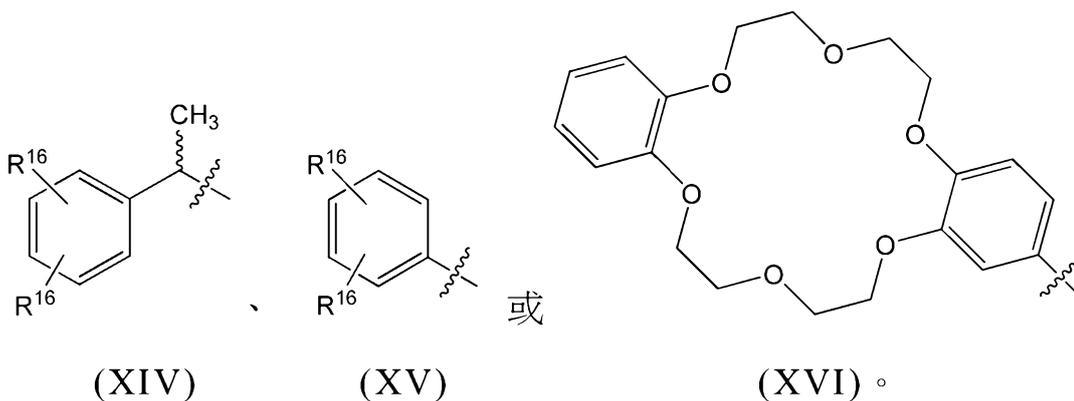
其中 R^{16} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 烷氧基、 $-CN$ 、芳基或雜芳基。

9. 如請求項6之寡聚物，其中至少一個 R^{12} 為 $-NH_2$ 、 $-N(CH_3)_2$ 或 $-N^+(CH_3)_3$ 。
10. 如請求項6之寡聚物，其中至少一個 R^{12} 為吡咯啉基、哌啉基或嗎

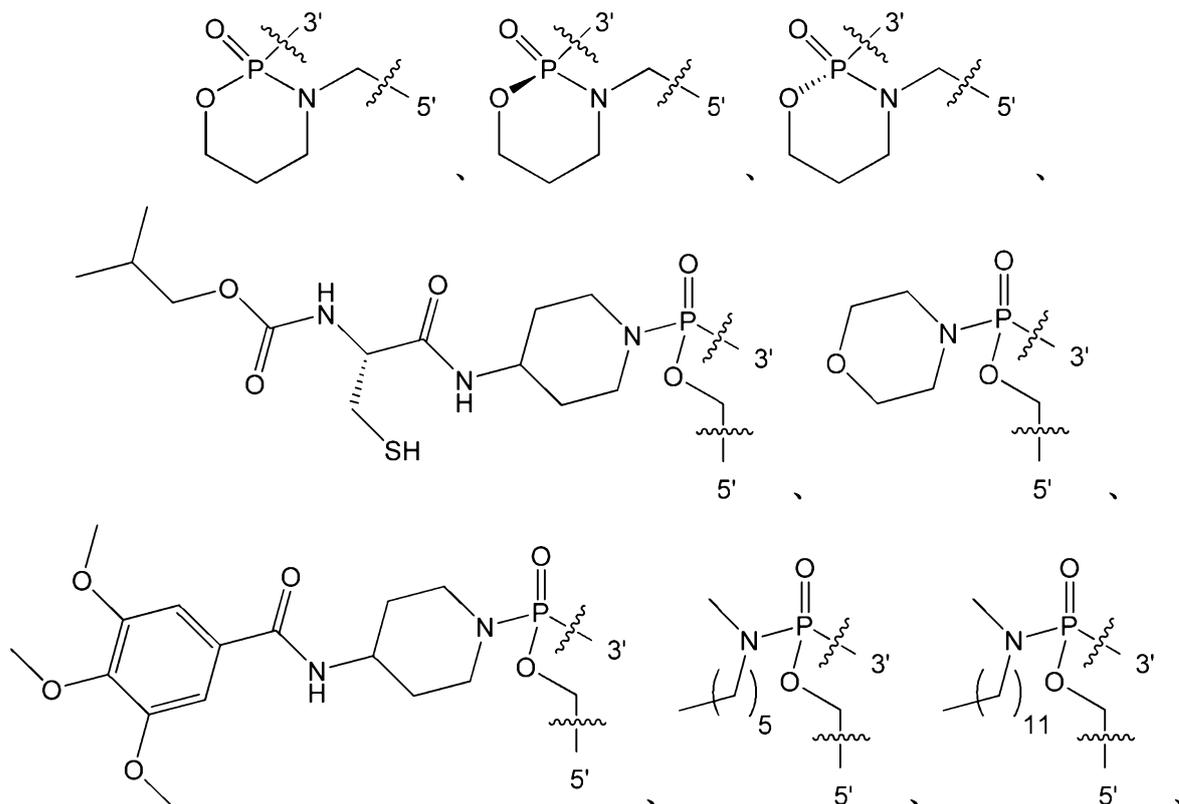


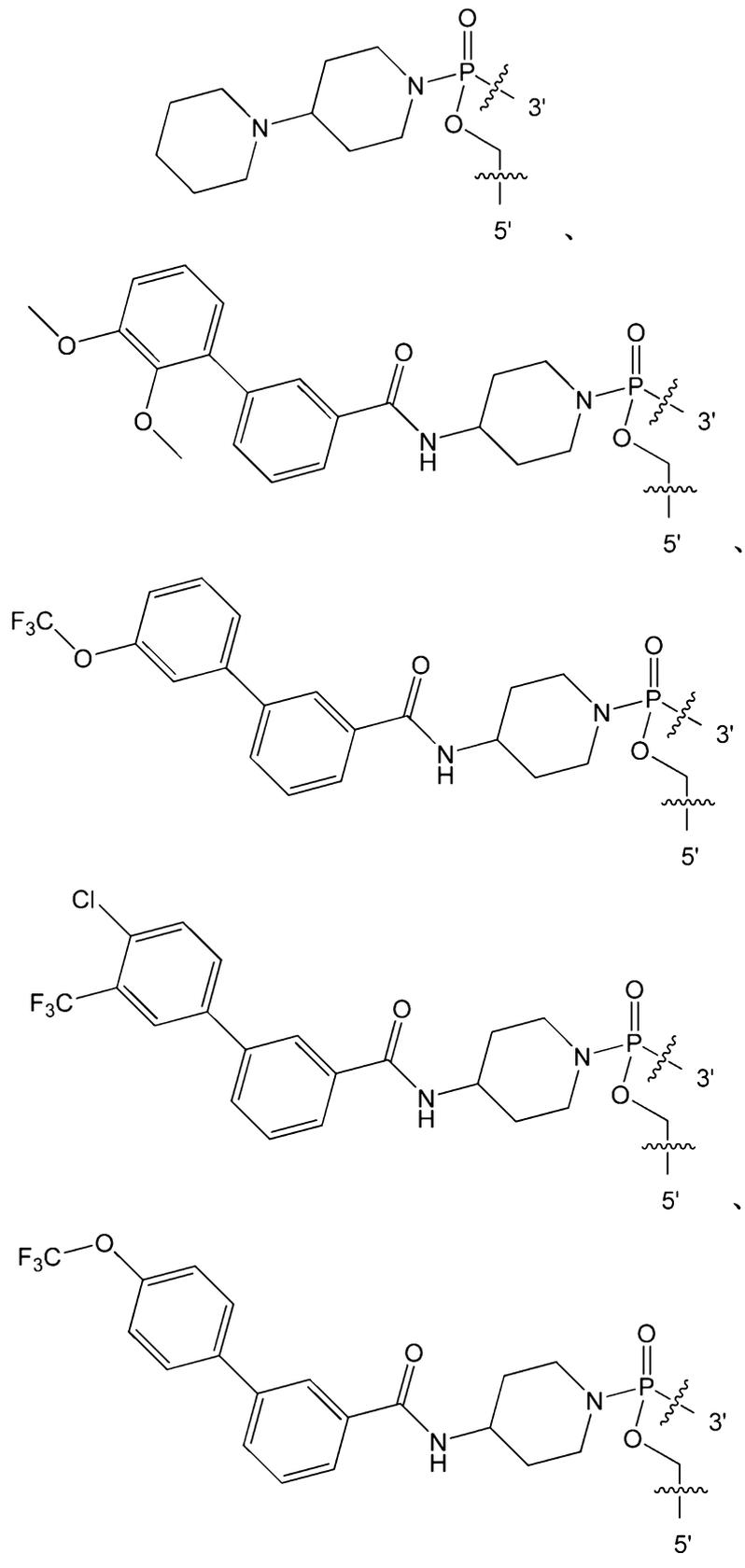
(XIII)。

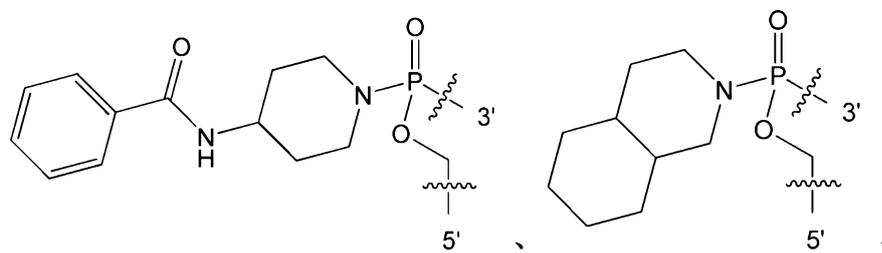
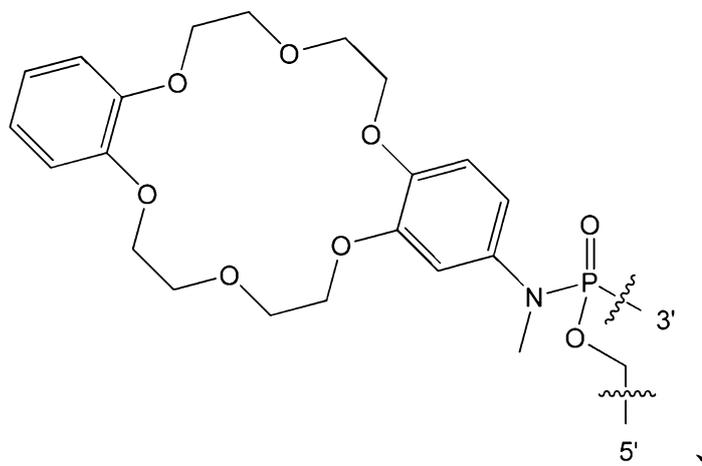
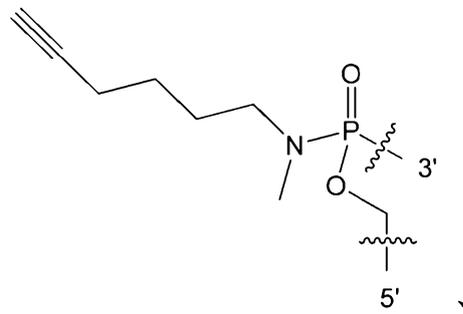
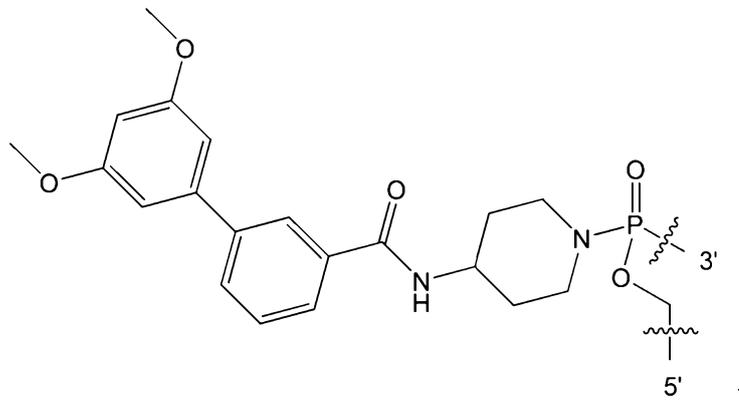
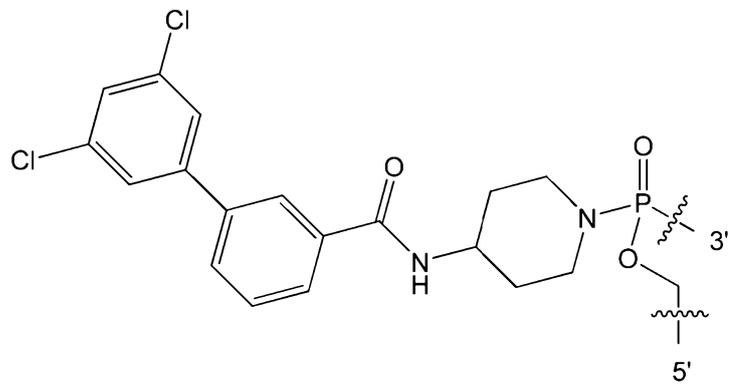
17. 如請求項 1 至 5 中任一項之寡聚物，其中對於至少一次出現之連結(B)， R^8 為 C_2-C_{12} 烷基且 R^9 為 C_1-C_{12} 烷基。
18. 如請求項 1 之寡聚物，其中 R^9 具有以下結構 (XIV)、(XV) 或 (XVI) 之一：

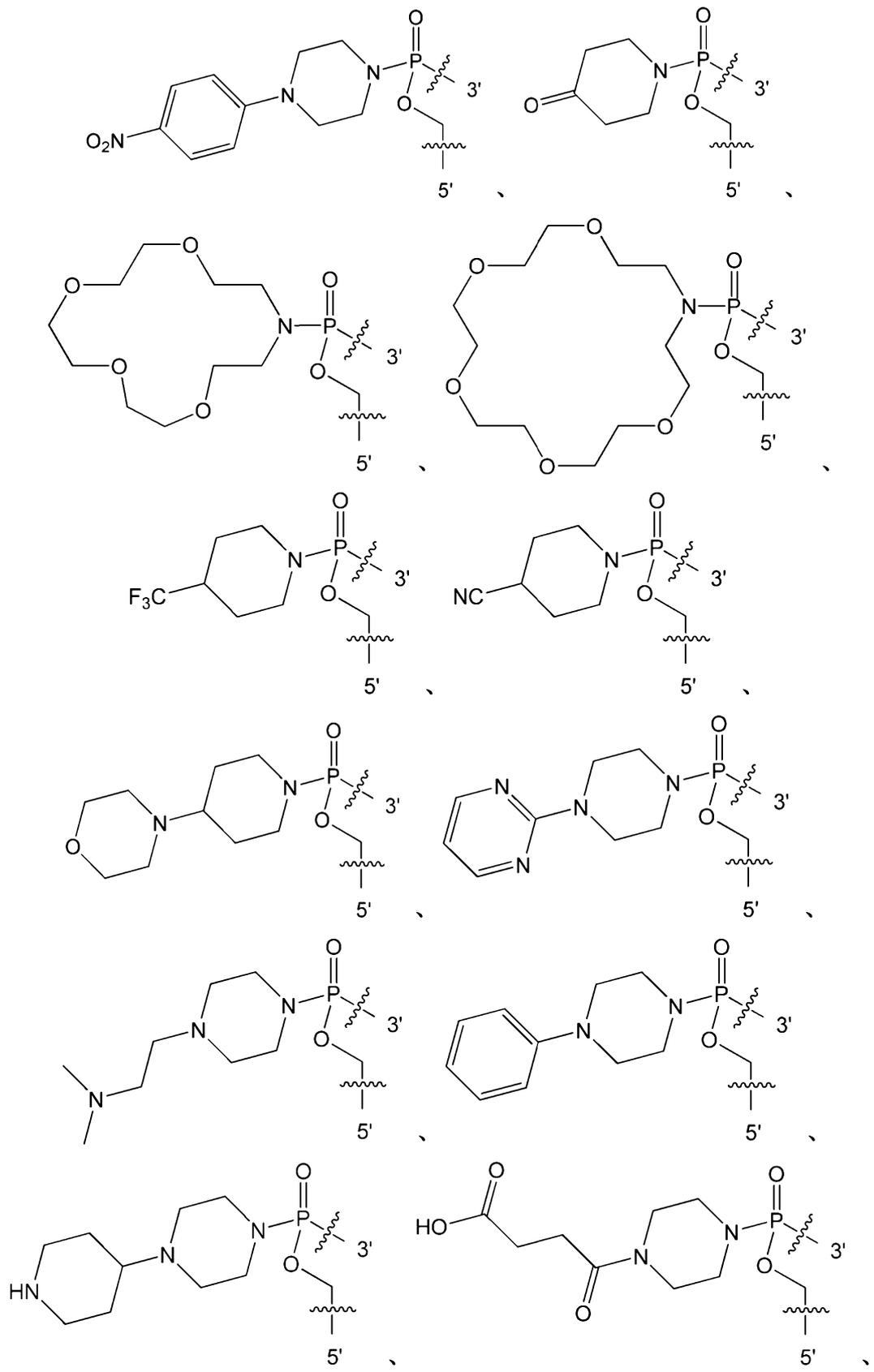


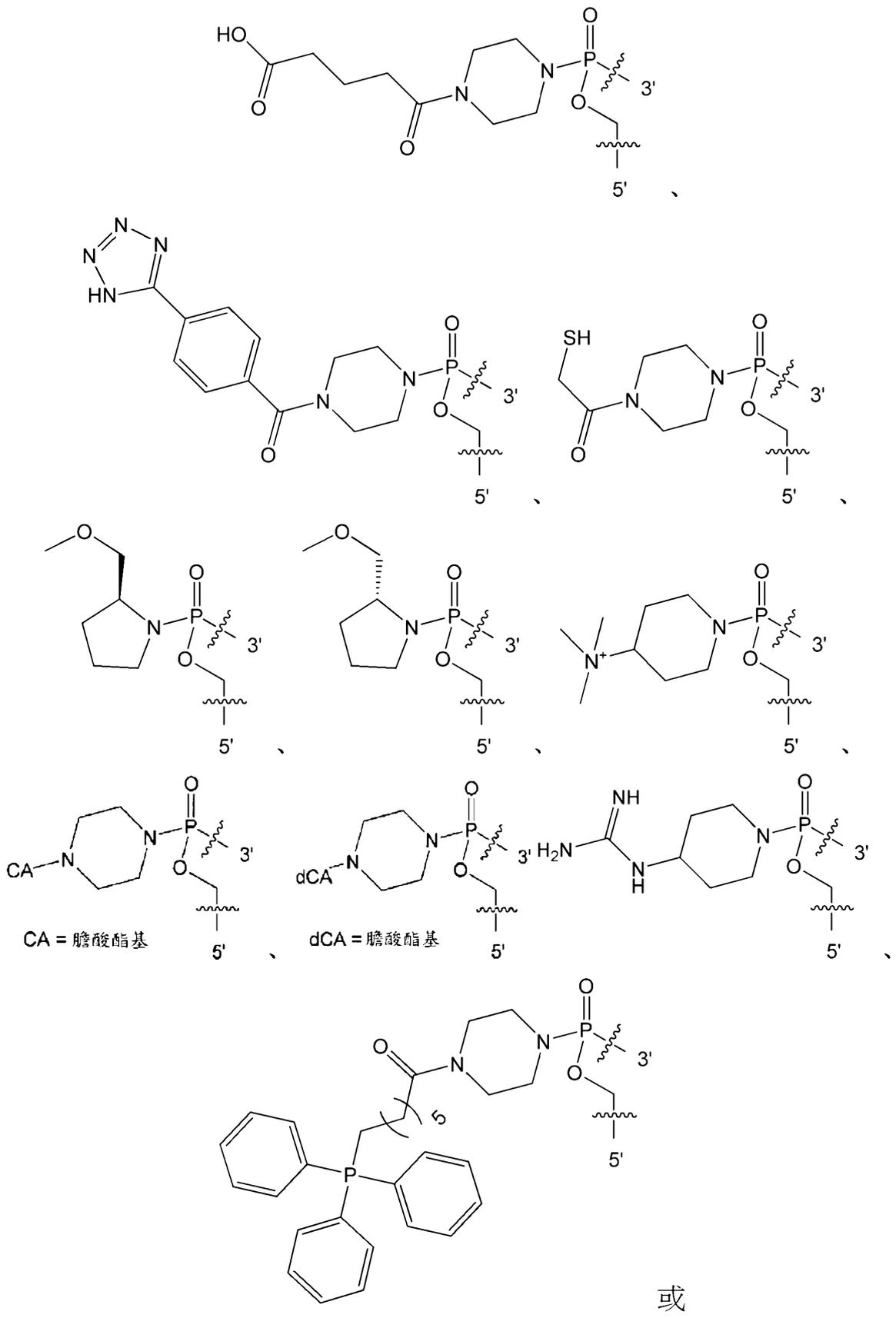
19. 如請求項 1 之寡聚物，其中至少一個連結(B)具有以下結構之一：











或其鹽或異構體，其中：

R^{17} 在每次出現時獨立地為不存在、氫或 C_1 - C_6 烷基；

R^{18} 及 R^{19} 在每次出現時獨立地為不存在、氫、細胞穿透肽、天然或非天然胺基酸、 C_2 - C_{30} 烷基羰基、 $-C(=O)OR^{21}$ 或 R^{20} ；

R^{20} 在每次出現時獨立地為胍基、雜環基、 C_1 - C_{30} 烷基、 C_3 - C_8 環烷基、 C_6 - C_{30} 芳基、 C_7 - C_{30} 芳烷基、 C_3 - C_{30} 烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基羰基、 C_3 - C_8 環烷基烷基羰基、 C_7 - C_{30} 芳基羰基、 C_7 - C_{30} 芳烷基羰基、 C_2 - C_{30} 烷氧基羰基、 C_3 - C_8 環烷氧基羰基、 C_7 - C_{30} 芳氧基羰基、 C_8 - C_{30} 芳烷基氧基羰基或 $-P(=O)(R^{22})_2$ ；

R^{21} 為包含一或多個氧或羥基部分或其組合之 C_1 - C_{30} 烷基；

各 R^{22} 獨立地為 C_6 - C_{12} 芳氧基；

Pi為鹼基配對部分；

L^1 為不存在或連結子，該連結子之長度多至18個原子，包含選自烷基、羥基、烷氧基、烷基胺基、醯胺、酯、羰基、胺基甲酸酯、磷二醯胺酸 (phosphorodiamidate)、磷醯胺酸 (phosphoramidate)、硫代磷酸酯及磷酸二酯之鍵；

x為0或大於0之整數；且

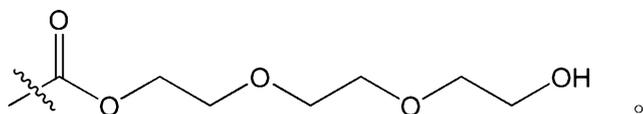
限制條件為 R^{17} 與 R^{18} 兩者均存在。

25. 如請求項24之寡聚物，其中 R^{18} 或 R^{19} 中之至少一者為 R^{20} 。
26. 如請求項25之寡聚物，其中 R^{20} 為三苯甲基、甲氧基三苯甲基、二苯甲基、對氯二苯甲基、三苯基乙醯基、三苯基丙基、二苯基乙醯基、氯二苯基乙醯基、羥基二苯基乙醯基、三苯基磷醯基、二苯基磷醯基、香葉草基(geranyl)、法呢基(farnesyl)、異戊二烯基(prenyl)、月桂醯基、三甲氧基苄醯基、三苯基丙醯基、三甲基甘胺酸、1-羥基-2,2-二苯基乙醯基、9-芴-羧基、5-羧基螢光素、 $-COCH_2CH_2SSPy$ 、 $-COCH_2SH$ 、4-咪唑基苄醯基、4-吡啶

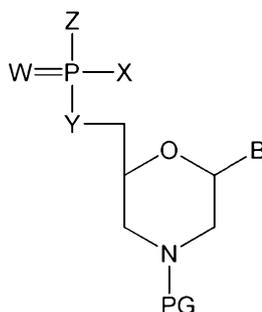
酮基苄醯基、甲基丁二醯亞胺基-環己醯基、三乙二醇醯基 (glycoloyl)、丁二酸乙醯基(succinicacetyl)、哌啶-4-基、三苯甲基哌啶-4-基、*boc*-哌啶-4-基、己炔-6-基、哌嗪-1-基或胍基。

27. 如請求項24之寡聚物，其中 R^{20} 為三苯甲基或三苯基乙醯基。

28. 如請求項24之寡聚物，其中 R^{19} 為哌嗪基或



29. 一種嗎啉基次單元，其中該嗎啉基次單元具有以下結構 (XXXI)：



(XXXI)

或其鹽或異構體，其中：

W在每次出現時獨立地為S或O；

X在每次出現時獨立地為 $-NR^8R^9$ 或 $-OR^3$ ；及

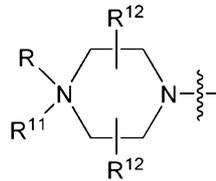
Y在每次出現時獨立地為O或 $-NR^{10}$ ；

R^8 在每次出現時獨立地為氫或 C_2-C_{12} 烷基；

R^9 在每次出現時獨立地為氫、 C_1-C_{12} 烷基、 C_1-C_{12} 芳烷基或芳基；

R^{10} 在每次出現時獨立地為氫、 C_1-C_{12} 烷基或 $-LNR^4R^5R^7$ ；

其中 R^8 與 R^9 可接合形成5-18員單環或雙環雜環，或 R^8 、 R^9 或 R^3 可與 R^{10} 接合形成5-7員雜環，且其中當X為4-哌嗪基時，X具有以下結構(III)：



(III)

其中：

R¹¹在每次出現時獨立地為C₂-C₁₂烷基、C₁-C₁₂胺基烷基、C₁-C₁₂烷基羰基、芳基、雜芳基或雜環基；及

R在每次出現時獨立地為電子對、氫或C₁-C₁₂烷基；及

R¹²在每次出現時獨立地為氫、C₁-C₁₂烷基、C₁-C₁₂胺基烷基、-NH₂、-CONH₂、-NR¹³R¹⁴、-NR¹³R¹⁴R¹⁵、C₁-C₁₂烷基羰基、側氧基、-CN、三氟甲基、醯胺基、脞基、脞基烷基、脞基烷基羰基、胍基、胍基烷基、胍基烷基羰基、膽酸酯基、去氧膽酸酯基、芳基、雜芳基、雜環、-SR¹³或C₁-C₁₂烷氧基，其中R¹³、R¹⁴及R¹⁵在每次出現時獨立地為C₁-C₁₂烷基；及

其中該等單元間連結中之至少一者為連結(B)；

Z為鹵基或對固體支撐物之連結；及

PG為C₇-C₃₀芳烷基。

30. 如請求項29之嗎啉基次單元，其中Z為氫。

31. 如請求項30之嗎啉基次單元，其中PG為三苯甲基或甲氧基三苯甲基。